



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Identificación de bacterias resistentes a betalactámicos
en aguas para riego agrícola en la Ramada,
Cundinamarca.**

ALEJANDRA OVIEDO CANCINO

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Bogotá D.C., Colombia

2021

**Identificación de bacterias resistentes a betalactámicos
en aguas para riego agrícola en la Ramada,
Cundinamarca.**

Alejandra Oviedo Cancino

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Microbiología

Director (a):

Ph. D. MARTHA CRISTINA BUSTOS LÓPEZ

Departamento de Ingeniería Civil y Agrícola

Codirector (a):

M.Sc. MARÍA TERESA REGUERO R.

Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia

Línea de Investigación en Contaminantes Emergentes

Grupo de Investigación RESA

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Bogotá, Colombia

2021

Dedicatoria

Al amor de mi vida,

“La ecuación de Schrödinger explica como las partículas representan la estructura de todo...”

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \left[\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \right] \psi(x, y, z) = [-\psi(x, y, z)]$$
$$\left[\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V\psi \right] i\hbar \frac{\partial}{\partial t} \psi$$

Es decir, tú eres la estructura de mi todo y al multiplicarla por el tiempo sería una función de onda completa, en pocas palabras...

TU HACES MI VIDA MÁS COMPLETA

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Alejandra Oviedo Cancino

Nombre

Fecha 14/04/2021

Fecha

Agradecimientos

Le agradezco a Dios por darme la oportunidad de cumplir otro sueño, por poner personas en mi vida que me han alcahueteado y han batallado conmigo a diario por ayudarme en lo que más me gusta hacer: Estudiar.

A mi mamá y mi tío por darme el apoyo incondicional en cada paso de mi vida, por brindarme su cariño y gratitud, porque sin la sabiduría de ellos no sería la persona que soy hoy en día. Por su voto de confianza y admiración que me tienen como profesional.

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología por financiar el trabajo mediante el proyecto: “Identificación de contaminantes emergentes y microbiológicos, análisis metagenómico bacteriano y perfil de resistencias a antibióticos en aguas de riego y hortalizas de la Sabana occidental de Cundinamarca.”

A la Doctora Rocío del Pilar Morales Delgado por ser la persona quien me ha guiado durante estos años, me ha compartido su conocimiento, por tomarse su valioso tiempo de enseñarme, corregirme y aconsejarme en la trayectoria de este proyecto. A quien admiro profundamente como persona, ya que, sin la ayuda de ella no me hubiese hallado en este camino de aprendizaje.

Al Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Universidad Nacional, por abrirme las puertas y darme las herramientas necesarias y prestarme sus instalaciones para llevar a cabo este nuevo logro como profesional. A cada una de las personas que me brindaron su compañerismo, su alegría y su discernimiento para obtener este título.

A la Doctora Pilar Donado de Agrosavia, por abrirme las puertas y hacer posible el cumplimiento y desarrollo de este trabajo.

A la Doctora Aura Lucia Leal por brindarme sus conocimientos, su ayuda y compromiso durante este largo recorrido.

Resumen

El presente trabajo se basó inicialmente en la caracterización fisicoquímica y microbiológica del agua de uso agrícola en la zona occidental de la Sabana de Cundinamarca, conocida como distrito de riego la Ramada, donde se midieron parámetros como pH, conductividad, temperatura, oxígeno disuelto (OD), demanda química de oxígeno (DQO), demanda biológica de oxígeno (DBO₅), carbono orgánico total (COT) y sólidos suspendidos totales (S.S.T.) y parámetros microbiológicos como recuento total de *Coliformes Totales* y *Escherichia coli*. Los muestreos se llevaron a cabo en seis puntos diferentes de la Ramada, donde el agua recolectada se analizó en el laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Universidad Nacional de Colombia.

Cabe mencionar, que los parámetros microbiológicos en las muestras de agua se analizaron mediante dos técnicas microbiológicas; la primera para establecer un recuento de la población total (NMP/100mL) y comparar los resultados con la normativa colombiana vigente (Decreto 1594 de 1984) para determinar si es apta para riego agrícola, y finalmente la técnica de filtración por membrana (UFC/100 mL) para obtener colonias aisladas de bacterias Gram negativas, que son de interés en este estudio; a las cuales se les determino el perfil de resistencia a antibióticos betalactámicos. Para llevar a cabo esto, inicialmente se realizó un pase de las colonias aisladas en Chromagares (ESBL – CARBA SMART) con el objetivo de seleccionarlas e identificarlas, para que, mediante el uso de herramientas automatizadas, se observará su perfil de sensibilidad.

Por otro lado, para determinar la presencia de antibióticos en estas aguas, se realizó una extracción en fase sólida mediante el uso de cartuchos de extracción OASIS HLA (60mg/3cc), para finalmente analizar las muestras mediante metodologías de residuos múltiples como cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS / MS),

con el objetivo de cuantificar los analitos en estudio. Teniendo en cuenta este panorama, se decidió caracterizar e identificar si hay presencia de microorganismos resistentes a antibióticos en aguas de uso agrícola del distrito la Ramada, Cundinamarca.

En la caracterización fisicoquímica y microbiológica del agua agrícola, se pudo observar que, parámetros como DQO arrojaron resultados que están entre rangos de 101 mg/L a 1276 mg/L para temporada lluvia, mientras que para temporada seca los rangos oscilaron 102 mg/L a 1301 mg/L, en cambio para DBO₅ los parámetros oscilaron 34 mg/L a 390 mg/L en temporada lluvia y para temporada seca fueron de 58 mg/L a 830 mg/L. Igualmente, los recuentos de bacterias como *E. coli* fueron mayores de 5000 NMP Log/100mL en el sitio 4 y sitio 6 en ambas temporadas.

Por su parte, se observó como en estas aguas agrícolas hubo presencia de antibióticos como clindamicina, obteniendo valores mínimos de 1.20 ng/L a 42 ng/L en ambas temporadas, azitromicina con valores máximos de 5550 ng/L y trimetropim con rangos entre 82 ng/L a 339.23 ng/L en temporada seca, mientras que para temporada lluvia oscilaron entre los 45 ng/L a 606.48 ng/L y a su vez, como en el sitio 6 el promedio para este antibiótico fue de 1418.24 ng/L, registrando la presencia de fármacos en aguas para fines agrícolas.

Igualmente, la identificación mediante técnicas automatizadas arrojó resultados interesantes, encontrando bacterias resistentes a antibióticos betalactámicos como *E. coli*, y *Klepsiella* sp., las cuales pueden causar enfermedades y ser relevantes en el ambiente clínico por su importancia para generar resistencia en antibióticos.

Palabras clave. *Aguas agrícolas, Escherichia coli, resistencia, antibióticos, perfil de sensibilidad, cromatografía.*

Abstract

Identification of bacteria resistant to beta-lactams in water for agricultural irrigation in La Ramada, Cundinamarca.

The present work was initially based on the physicochemical and microbiological characterization of water for agricultural use in the western zone of the Cundinamarca Plains, known as the Ramada irrigation district. Parameters such as pH, conductivity, temperature, dissolved oxygen (DO), chemical oxygen demand (COD), biological oxygen demand (BOD₅), total organic carbon (TOC) and total suspended solids (TSS) and microbiological parameters such as total coliforms and *Escherichia coli* count were measured. The samplings were carried out in six different points of the Ramada district, which were: Site 1, Site 2, Site 3, Site 4, Site 5, and Site 6; the collected water was analyzed in the Environmental Engineering laboratory of the Universidad Nacional de Colombia.

It is worth mentioning that the microbiological parameters in the water samples were analyzed using two microbiological techniques; the first to establish a count of the total population (MPN / 100mL) and compare the results with the current Colombian regulations (Decree 1594 of 1984) and determine if it is suitable for agricultural irrigation, and finally the membrane filtration technique (CFU/100 mL) to obtain isolated colonies of Gram negative bacteria, which are of interest in this study; to which resistance to beta-lactam antibiotics was evaluated; these were contacted with Chromagares (ESBL - CARBA SMART) in order to select and identify them, so that, through the use of automated tools, their sensitivity profile could be observed.

On the other hand, to determine the presence of antibiotics in these waters, a solid phase extraction was carried out using OASIS HLA extraction cartridges (60mg / 3cc), to finally analyze the samples using multiple residue methodologies such as coupled liquid chromatography to mass spectrometry (LC-MS / MS), in order to quantify the analytes under study. Taking this scenario into account, it was decided to characterize and identify whether there is the presence of multi-resistant microorganisms to antibiotics in waters for agricultural use in the La Ramada district, Cundinamarca. It was observed that in these

agricultural waters there was presence of antibiotics such as clindamycin, obtaining minimum values of 1.20 ng/L to 42 ng/L in both seasons, azithromycin with maximum values of 5550 ng/L and trimethoprim with ranges between 82 ng/L to 339.23 ng/L in the dry season, while for the rainy season they ranged from 45 ng/L to 606.48 ng/L and in turn, as in site 6, the average for this antibiotic was 1418.24 ng/L, recording the presence of drugs in waters for agricultural purposes.

In the physicochemical and microbiological characterization of agricultural water, it could be observed that parameters such as COD yielded results ranging from 101 mg/L to 1276 mg/L for the rainy season, while for the dry season the ranges ranged from 102 mg/L at 1301 mg/L, on the other hand for BOD₅ the parameters ranged from 34 mg/L to 390 mg/L in the rainy season and for the dry season they were from 58 mg/L to 830 mg/L. Likewise, the counts of bacteria such as *E. coli* were greater than 5 MPN Log/100mL in both seasons, whereas for site 6 the limits exceed values of 7 MPN Log/100mL.

Likewise, the identification using automated techniques yielded interesting results, finding bacteria such as *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* and *Klepsiella spp.*, Which can cause diseases and be relevant in the clinical environment due to their importance in generating antibiotic resistance.

Keywords. *Agricultural waters, Escherichia coli, resistance, antibiotics, sensitivity profile, chromatography.*

Contenido

Lista de figuras	XV
Lista de tablas	XVI
Lista de gráficas.....	XVII
INTRODUCCIÓN	1
1. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	5
1.1 Hipótesis.....	5
2. OBJETIVOS.....	6
2.1 Objetivo general.....	6
2.2 Objetivos específicos	6
3. MARCO TEÓRICO.....	7
3.1 Aguas residuales	7
3.2 Distrito de Riego la Ramada	10
3.3 Reuso de aguas residuales en cultivos de hortalizas	12
3.4 Antibióticos en aguas superficiales	14
3.5 Resistencia a los antimicrobianos	17
3.5.1 Mecanismos de resistencia.....	19
3.5.2 Mecanismos de resistencia de Bacterias Gram negativas	20
3.5.3 Herramientas para el diagnóstico microbiológico	23
3.6 Identificación y detección bacteriana	23
3.7 Perfil de susceptibilidad antimicrobiana	24
3.8 Identificación fenotípica	24
3.8.1 Test bioquímicos.....	25
3.8.2 Medios Cromogénicos	25
3.8.3 Herramientas de Diagnóstico microbiológico	26
3.9 Espectrometría de masas	28
4. METODOLOGÍA	31
4.1 Área de estudio.....	31
4.2 Materiales y métodos.....	38
4.2.1 Recolección de muestras.....	38
4.2.2 Análisis y extracción de antibióticos	39
4.2.3 Aislamiento de <i>Coliformes totales</i> y <i>Escherichia coli</i>	40
4.2.4 Selección de bacterias con posible resistencia	41
4.2.5 Identificación bacteriana	41

4.2.6	Determinación del perfil de resistencia	42
4.3	Análisis estadístico	42
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
5.1	Medición de parámetros <i>In situ</i>	45
5.1.1	Determinación de nitrógeno, fosforo, sulfatos y cloruros	48
5.1.2	Determinación DQO, DBO ₅ y COT	52
5.1.3	Determinación de <i>Coliformes totales</i> y <i>Escherichia coli</i>	55
5.1.4	Análisis de componentes principales.....	58
5.2	Antibióticos en aguas de uso agrícola	62
5.3	Aislamiento, selección de posible resistencia a betalactámicos e identificación bacteriana	70
5.3.1	Determinación del perfil de susceptibilidad.....	72
6.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	81
6.1	Recomendaciones.....	82
7.	BIBLIOGRAFIA.....	83
8.	ANEXOS	95

Lista de figuras

	Pág.
Figura 3-1. Sistema de riego en Colombia a través de los años.....	11
Figura 3-2. Manufactura de los antimicrobianos.....	16
Figura 3-3. Blanco de los antibióticos y ejemplos de mecanismos de resistencia para antibióticos seleccionados.	20
Figura 3-4. Medio Cromogénicos (ChromID CARBA) empleando una combinación de sustratos cromogénicos para la detección de carbapenemasas en <i>Enterobacteriaceae</i>	26
Figura 3-5. Montaje de MicroScan para la identificación y evaluación de la susceptibilidad microbiana.	27
Figura 3-6. Métodos de identificación microbiana: medios cromogénicos y microscópicos, técnicas bioquímicas y moleculares.	29
Figura 4-1. Zona de muestreo, Distrito de Riego la Ramada.	32
Figura 4-2. Zona de producción agrícola de hortalizas, El Tabaco.	33
Figura 4-3. Zona de actividad agrícola, Canal Venecia.	33
Figura 4-4. Centro de investigación agrícola y agropecuario de la Universidad Nacional de Colombia, Marengo.....	34
Figura 4-5. Zona de muestreo, Barrios Villa Cety.....	35
Figura 4-6. Zona de muestreo, Entrada a Barrios.....	36
Figura 4-7. Zona de actividades agroindustriales y residenciales, Barrio el Lucero.....	37
Figura 4-8. Imagen representativa de la identificación de Bacterias Gram negativas por el método Chromocult.	40
Figura 4-9. Cepas control <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 positiva para ESBL y <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA1705 positiva para KPC.	41

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 3-1 <i>Patógenos y sustancias contaminantes presentes en agua residual de riego agrícola</i>	8
Tabla 3-2 <i>Efectos en el suelo por el uso de aguas residuales de riego agrícola</i>	9
Tabla 3-3 <i>Clasificación de carbapenemasas</i>	22
Tabla 4-1 <i>Cronograma de muestreo en época seca y época lluvia</i>	38
Tabla 5-1. <i>Media de parámetros físico químicos medidos en aguas de re uso agrícola del Distrito de Riego la Ramada</i>	50
Tabla 5-2 <i>Media de COT de los diferentes sitios de muestreo medidos en aguas de re uso agrícola del Distrito de Riego la Ramada</i>	54
Tabla 5-3. <i>Rango de concentraciones (ng/L) de antibióticos presentes en los diferentes sitios de muestreo</i>	64
Tabla 5-4. <i>Aislamiento de bacterias con posible resistencia a betalactámicos en temporada lluvia y temporada seca de los diferentes sitios de muestreo</i>	70
Tabla 5-5. <i>Perfil de susceptibilidad de bacterias como E. coli, Citrobacter freundii y Klebsiella spp., aisladas en muestras de agua mediante análisis VITEK</i>	76

Lista de gráficas

Gráfica 5-1. <i>Media de las precipitaciones mensuales de los años 2001 a 2019 en el Distrito de Riego la Ramada, Cundinamarca.</i>	44
Gráfica 5-2. Promedio de OD ($\text{mg/L}^{-1} \text{O}_2$), pH y conductividad ($\mu\text{S/cm}$) en aguas de uso agrícola del Distrito de Riego de la Ramada.	47
Gráfica 5-3. Media de valores de DQO (mg/L O_2), DBO_5 (mg/L O_2) en aguas de uso agrícola del Distrito de Riego la Ramada.	53
Gráfica 5-4. Media obtenida para determinar S.S.T mg/L en aguas de uso agrícola en el Distrito de Riego la Ramada.	55
Gráfica 5-5. NMP/100mL de <i>Coliformes totales</i> y <i>E. coli</i> en aguas de uso agrícola del Distrito de Riego la Ramada.	57
Gráfica 5-6. Análisis PCA de los datos evaluados en agua para uso agrícola en Temporada seca.	59
Gráfica 5-7. Análisis PCA en agua para uso agrícola en Temporada Lluvia.	61
Gráfica 5-8. Correlación de presencia de antibióticos en diferentes sitios de muestreo en Temporada lluvia	67
Gráfica 5-9. Correlación de presencia de antibióticos en diferentes sitios de muestreo en Temporada lluvia.	67
Gráfica 5-10. Concentración de ng/L de ciprofloxacina en los diferentes sitios de muestreo en ambas temporadas.	69
Gráfica 5-11. <i>Porcentaje de recuperación de Enterobacterias de interés clínico en aguas de uso agrícola del Distrito de Riego la Ramada.</i>	71
Gráfica 5-12. <i>Comparación de bacterias aisladas de efluentes agrícolas con resistencia a antibióticos betalactámicos y cepas con producción de AmpC en Temporada seca y Temporada lluvia.</i>	74
Gráfica 5-13. <i>Porcentaje de resistencia a antibióticos betalactámicos de Enterobacterias aisladas en aguas para uso agrícola.</i>	77

GLOSARIO

Aguas residuales: Aguas usadas y sólidos que se introducen en las alcantarillas, transportados mediante el sistema de alcantarillado. En general, se consideran las siguientes:

Aguas residuales domésticas: son los residuos líquidos provenientes de las actividades domésticas en las viviendas o residencias, edificios e instituciones.

Aguas residuales municipales: son todos los residuos líquidos transportados por el alcantarillado de una ciudad, seguidos de un tratamiento previo realizado en las plantas de tratamiento de la ciudad.

Aguas residuales industriales: son aquellos residuos líquidos provenientes de industrias de manufactura.

Aguas para riego: Se define como el agua que se aplica mediante diferentes sistemas de regadío para el correcto desarrollo de los cultivos. Su origen puede ser muy diverso ya que puede proceder de ríos, lagos o corrientes continuas de aguas naturales, de pozos entre otros.

Aguas negras: son las aguas residuales provenientes de inodoros que llevan excrementos y orina del hombre.

Aguas grises: son las aguas residuales provenientes de tinas, duchas, lavamanos, lavadoras; también denominadas aguas residuales domésticas excluyendo la de los inodoros.

Bacteria: Microorganismo unicelular sin núcleo diferenciado, algunas de cuyas especies descomponen la materia orgánica, mientras que otras causan enfermedades.

Contaminantes emergentes: Compuestos contaminantes de origen y naturaleza química, cuya presencia en el medio ambiente acarrearán problemas de salud.

Cultivos cromogénicos: Ayuda a identificar los principales patógenos que causan infecciones, por medio de una mezcla con sustratos cromogénicos se logra detectar y diferenciar las distintas especies bacterianas.

Métodos automatizados: Los sistemas automatizados acortan estos tiempos porque mejoran la sensibilidad analítica de los métodos, es decir, son capaces de detectar el desarrollo bacteriano en una suspensión, con y sin antimicrobianos, estableciendo la mínima concentración del antimicrobiano que es capaz de inhibir el desarrollo bacteriano (CIM).

PTAR: Planta de tratamiento de agua residual.

Resistencia antimicrobianos: Es el fenómeno por el cual un microorganismo deja de ser afectado por un antimicrobiano al que anteriormente era sensible. Es consecuencia de la capacidad de ciertos microorganismos de neutralizar el efecto de los fármacos, como los antibióticos.

Reuso: Es la explotación, uso o aprovechamiento de aguas residuales con o sin tratamiento previo, es decir, su reutilización dentro del territorio en el cual un asignatario provee el servicio público domiciliario de agua potable o en las instalaciones de un concesionario, o bien, conduciéndola mediante un canal o tubería hacia un sitio distinto para beneficio de un tercero.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el uso de efluentes domésticos para uso agrícola a nivel mundial ha comenzado a ser una práctica más recurrente, debido a diversos factores como: crecimiento descontrolado de asentamientos urbanos, escasez de agua potable, recuperación de nutrientes para los cultivos y menos costos de eliminación. Igualmente, su uso en la agricultura conlleva no solo a la contaminación de aguas superficiales y subterráneas, sino también a la contaminación del suelo, sin tener en cuenta los riesgos que afectan la salud poblacional (Huibers & Raschid-Sally, 2005; Wang, Li, & Li, 2017).

La disminución de recursos hídricos naturales (cuerpos de agua superficial y subterránea) causadas por el cambio climático y el aumento en la población, generan no solo contaminación en los canales para riego agrícola, sino también contaminación a nivel de acuífero por la alta cantidad de materia orgánica y la presencia de microorganismos patógenos que generan enfermedades diarreicas. A pesar de su alto impacto, estas aguas permiten ser una alternativa de riego en la agricultura en regiones que experimentan escasez de agua, sustituyendo aguas dulces con un correcto tratamiento antes de su uso (Grandclément *et al.*, 2017; FAO, 2002), debido a las concentraciones de macronutrientes (Nitrógeno, fósforo y potasio), micronutrientes (Ca, Mg, B, Fe, Mn o Zn) y materia orgánica, que aportan para el mejoramiento de la calidad en los cultivos y a su vez por la reducción en el uso de fertilizantes y agroquímicos (Jaramillo & Restrepo, 2017; Seid & Drechsel, 2009), pero a pesar del beneficio que esta pueda traer, existen riesgos que son devastadores no solo por su consumo, sino por la acumulación de contaminantes que se pueden presentar en el suelo y en las mismas plantas. Se ha reportado a través de los años, cantidades considerables de metales, solutos y sales que han venido cambiando las propiedades físicas del agua (Qian & Lin, 2019) y por supuesto las del suelo; así mismo, el cambio en las comunidades nativas de microorganismos, que juegan un papel importante en la toma de nutrientes (Fosforo, Nitrógeno, Carbono) y aseguran el cumplimiento de los ciclos geoquímicos.

Aunque existen medidas regulatorias y/o soluciones técnicas (pretratamientos, tratamientos de desinfección) estas no son suficientes, debido a la escases de recursos económicos, ya que, al no tener aguas de re uso tratadas puede aumentar la contaminación de suelos y aguas subterráneas por la presencia no solo de patógenos, sino de metales pesados y contaminantes emergentes (Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial., 2010).

No obstante, a pesar de la normativa que se ha venido instaurando a nivel mundial con el desarrollo de guías y manuales, el cumplimiento se ha quedado corto por parte de países en vías de desarrollo, ya sea por falta de información, por falta de ejecución de políticas o creación de normativas. Por ejemplo, en Colombia se tiene instaurado el Decreto 1594 de 1984, el cual resulta ser muy permisible teniendo en cuenta las problemáticas de contaminación microbiológica que se presentan a nivel mundial. Por otro lado, el aumento en la utilización de productos de cuidado personal, químicos industriales, pesticidas, metales pesados y compuestos farmacéuticos como medicamentos y antibióticos; se ha incrementado durante los últimos años y ha tenido efectos directos en la salud de los consumidores por la prescripción inadecuada o el uso indebido de estos y problemas en el medio ambiente, debido a la acumulación de grandes cantidades de antibióticos que entran a las plantas de tratamiento de aguas residuales, las cuales no están diseñadas para eliminar este tipo de compuestos (Carlet, Rambaud, & Pulcini, 2012; Harrabi *et al.*, 2018) por la naturaleza química que presentan, ya que, al no ser degradados completamente por el organismo, un 80% queda en forma inalterada o como metabolito secundario permaneciendo biodisponibles en el suelo, en los tejidos de alimentos que son consumidos diariamente como tomates, lechugas, zanahorias, patatas (Christou *et al.*, 2017) presentando como consecuencia una disrupción endocrina y más alteraciones sistémicas (Campo, Lorenzo, Cammeraat, Picó, & Andreu, 2017; Campo *et al.*, 2016), mientras que en el agua, su ingreso se da por medio de fugas en los alcantarillados, descargas de industrias pecuarias y a través de la infiltración en el suelo por el uso de biofertilizantes enriquecidos con estiércol, escorrentías superficiales y lixiviados (Tran *et al.*, 2016).

Estudios en la zona alta y zona baja de los ríos en países como China y España evidenciaron diferentes concentraciones (ng/L) de familias de antibióticos después de ser

pretratadas, encontrándose principalmente tetraciclinas, sulfonamidas y quinolonas, sugiriendo que estos contaminantes no se degradan y resultan ser una fuente de contaminación al desembocar en cuerpos de agua naturales (Barancheshme & Munir, 2018; Rodríguez-Mozaz *et al.*, 2015). Igualmente, sucede con los compuestos agroquímicos, los cuales se pueden encontrar residuos de ellos en el medio ambiente, afectando directamente la población presente en estos entornos, evitando el desarrollo de procesos bioquímicos o ayudando a la diseminación de genes de resistencia por la presión selectiva que pueden tener en contacto con bajas concentraciones de antibióticos (Amos *et al.*, 2014), mediante transposones, plásmidos e integrones, ya que, por su naturaleza química no se degradan fácilmente, quedando disponibles durante largos periodos de tiempo en aguas y sedimentos (Qiao *et al.*, 2018; Osińska *et al.*, 2017).

En septiembre de 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS), informó que el aumento de resistencia a antibióticos frente a las infecciones por bacterias, presenta un peligro para la salud y se espera que en el futuro, cuando las personas sufran de infecciones menores o cirugías de baja complejidad resulten siendo una amenaza, incluyendo una gran diseminación de bacterias resistentes a múltiples antibióticos, infecciones sin opciones terapéuticas, y por lo tanto efectos sociales y económicos (WHO, 2017).

En la actualidad esta problemática se ha venido acrecentando por el uso indiscriminado de antimicrobianos y la falta de vigilancia y control por entes regulatorios, observando como la presencia de bacterias resistentes a antibióticos en hospitales ha aumentado, siendo difícil su tratamiento con los medicamentos convencionales y de igual forma, siendo su detección más compleja, por ello, se han comenzado a implementar herramientas moleculares, no solo para su identificación, sino para estudiar los mecanismos que emplean para su resistencia, como el uso de PCR y qPCR (Nesme *et al.*, 2014; Solliec *et al.*, 2016).

La Sabana Occidental de Cundinamarca, específicamente en el Distrito de riego la Ramada (zona destinada como abastecimiento de irrigación de cultivos y hortalizas) se ha venido monitoreando desde el año 2003 por el grupo de trabajo del Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Universidad Nacional de Colombia, donde se ha encontrado concentraciones altas de microorganismos patógenos como *E. coli* y *Coliformes totales*,

debido a que se ha incrementado la población a lo largo de los años y por falta de saneamiento de los vertimientos de actividades industriales, domésticas y agropecuarias generados en esta zona (Guevara y Calle 2005), pero no solo evidenciado la presencia de estos microorganismos, sino a su vez, moléculas como acetaminofén/paracetamol, carbamazepina, diclofenaco, claritromicina, ibuprofeno, gemfibrozil, licomicina, losartan, valsartan, cafeína sucralosa y cocaína (Hernández *et al.*, 2015) en aguas superficiales de uso agrícola de la Ramada, Cundinamarca, logrando por primera vez en Colombia hacer una revisión de la presencia de fármacos y sus metabolitos en ambientes acuáticos, reflejando una problemática para las personas que manipulan estas aguas y para los consumidores de vegetales que son irrigados con las mismas, no solo por la presencia de bacterias y fármacos, sino por la posible resistencia que se puede estar generando.

Teniendo en cuenta este tipo de antecedentes que se han venido registrando y estudiando en la zona de riego la Ramada, se decidió plantear un proyecto de investigación donde se pudiese identificar bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* presentes en aguas usadas para la irrigación de hortalizas de consumo directo y determinar su perfil de susceptibilidad a antibióticos betalactámicos.

1. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Hay presencia de bacterias resistentes a antibióticos betalactámicos en el agua superficial de uso para fines agrícolas en el Distrito de Riego la Ramada, Cundinamarca?

1.1 Hipótesis

La descarga puntual de agua residual doméstica en cuerpos de aguas superficiales en la Sabana Occidental de Cundinamarca contiene altos niveles de contaminantes fisicoquímicos y microbiológicos, junto con la presencia de fármacos específicamente antibióticos de uso humano que son liberados a través de la orina o heces fecales a los alcantarillados, llegando finalmente a aguas que son utilizadas para uso agrícola sin ningún tipo de tratamiento previo. De acuerdo con esto, el resultado final es la mezcla en el ambiente acuático, de microorganismos posiblemente patógenos, contaminantes emergentes y microbiota ambiental, ejerciendo posibles presiones selectivas entre comunidades bacterianas, incrementando o generando así resistencia a diferentes tipos de antibióticos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Identificar si hay presencia de microorganismos resistentes a antibióticos betalactámicos en aguas superficiales usadas para riego en la Ramada, Cundinamarca.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar la calidad fisicoquímica y microbiológica en el agua residual superficial usada para la producción agrícola en la Ramada, Cundinamarca.
- Evaluar si hay presencia de contaminantes emergentes en agua superficial de uso agrícola en la Ramada, Cundinamarca.
- Identificar y determinar el perfil de resistencia de las bacterias aisladas, mediante el uso de sistemas automatizados.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Aguas residuales

La composición de las aguas residuales (siendo de origen doméstico, industrial o institucional) pueden contener altos niveles de materia orgánica, sólidos flotantes, sólidos sedimentables y microorganismos patógenos que confieren un riesgo para la salud, pero que en la actualidad se ha comenzado a reflejar cierta preocupación por la aparición de nuevos contaminantes como productos de uso común como detergentes, suavizantes y así mismo, concentraciones de medicamentos y/o antibióticos (Mohammed & Elbably, 2016; Unesco, 2017).

Actualmente, el uso de agua residual se ha incrementado principalmente en el sector agrícola, a pesar de que solo el 10% es utilizado para este fin, esta actividad genera el mayor consumo de agua dulce en el planeta (Unesco, 2015). Su empleo se debe especialmente por:

- Aumento de la escasez de agua y la degradación de los recursos hídricos como resultado de la mala disposición de estos vertimientos.
- Incremento en la población y extensión en la demanda de alimentos
- Reconocimiento del valor nutricional que tienen por la cantidad de materia orgánica disponible.

En América Latina se estima que cerca de 400 m³ de agua residual es descargada directamente a cuerpos de agua superficiales; en Colombia 1.230.193 hectáreas son

irrigadas con fuentes de aguas superficiales sin tratar. Del total de aguas residuales generadas, solo el 27% es agua tratada y el 73% es agua no tratada (Silva, Torres, & Madera, 2008), la cual es destinada para la irrigación en cultivos agrícolas; que al no tener un pretratamiento antes de su uso, pueden diseminar patógenos y ocasionando enfermedades de tipo gastrointestinal.

A pesar de, que se obtengan beneficios con el re uso, este tipo de aguas residuales al no ser debidamente tratadas pueden representar una gran amenaza en salud pública, calidad ambiental y seguridad alimentaria. Así mismo, las concentraciones de virus, parásitos y helmintos pueden ser de 10 a 1000 veces más altos en los países en vía de desarrollo que en los países desarrollados (Jiménez *et al.*, 2009).

A continuación, se observa en la **Tabla 3-1** los patógenos más comunes y sustancias contaminantes asociadas con el re uso de aguas residuales para irrigación:

Tabla 3-1 Patógenos y sustancias contaminantes presentes en agua residual de riego agrícola

Tipo de riesgo		Patógenos
Biológicos	Bacterias	<i>E. coli</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Salmonella</i> sp., <i>Shigella</i> sp.
	Helmintos	Ascaris, Ancylostoma, Tenia.
	Protozoarios	Giardia intestinalis, Cryptosporidium, Entamoeba.
	Virus	Hepatitis A, E, Adenovirus, Rotavirus, Norovirus
Tipo de riesgo		Substancias sanitarias
Químicos	Metales pesados	Arsénico, Cadmio, Mercurio
	Hidrocarburos	Dioxinas, Furanos, PCBs
	Pesticidas	DDT
	Antibióticos/Fármacos	Paracetamol, Diclofenaco, Ciprofloxacina, Tetraciclinas.

Tomado y modificado de World Health Organization (WHO), 2006.

Sin embargo, a pesar de los beneficios que ofrece el uso de estas aguas para la irrigación en cultivos, también se pueden encontrar efectos negativos como el cambio en las propiedades físicas del suelo, aumento en la materia orgánica, presencia de sales, presencia de metales pesados y de contaminantes que pueden afectar las interacciones entre la microbiota exógena y endógena, así como, el desarrollo de la producción agrícola (Libutti *et al.*, 2018).

No obstante, esto también se puede llevar a cabo por el exceso de nutrientes, es decir, la acumulación de nitrógeno inorgánico, que afecta principalmente la actividad catabólica microbiana y la biodegradación de compuestos de carbono presentes en el suelo (Becerra-Castro *et al.*, 2015).

Sin embargo, a pesar de la problemática que se observa por la presencia de microorganismos patógenos, las características del suelo también se pueden ver afectadas por el uso de aguas residuales, como se puede observar en la **Tabla 3-2**:

Tabla 3-2 Efectos en el suelo por el uso de aguas residuales de riego agrícola

Parámetros	Propiedades fisicoquímicas	Propiedades microbiológicas	Referencias
pH	Incremento en la disponibilidad de nutrientes Mineralización de materia orgánica Mejora la capacidad de intercambio iónico	Aumenta la riqueza y la diversidad la comunidad bacteriana	(Cheng <i>et al.</i> , 2013; Fierer & Jackson, 2006; Rousk <i>et al.</i> , 2010)
Materia orgánica	Estabilidad de la estructura del suelo Retención de agua Aumento COT Mejora el contenido de nutrientes Capacidad Buffer Actividad enzimática y disponibilidad de nutrientes	Selección específica de poblaciones bacterianas Microhábitats en el suelo	(DeForest, Zak, Pregitzer, & Burton, 2004; Øvreås, 2002; Ranjard & Richaume, 2001; Van-camp <i>et al.</i> , 2004)
Nutrientes (N, P, K)	Incremento de materia orgánica en el suelo Retención de agua Lixiviación a aguas subterráneas Mejora en el contenido de nutrientes Riesgo de eutrofización en ambientes acuáticos	Perturbación de la actividad metabólica de las comunidades bacterianas presentes en el suelo	(Candela <i>et al.</i> , 2007; De Oliveira <i>et al.</i> , 2014; Matheyarasu, Bolan, & Naidu, 2016; Wu, 1999)
Salinidad	Lixiviación de metales pesados Cambios en la estructura del suelo Permeabilidad Aumento en la compactación del suelo Variabilidad del pH	Cambios en los microhábitats Variación en la riqueza y diversidad microbiana	(Ke <i>et al.</i> , 2013; Roberson & Firestone, 1993; Smit <i>et al.</i> , 2001)
Contaminantes	Toxicidad en el suelo Posible contaminación de la cadena alimentaria Mineralización de materia orgánica Cambios en la actividad enzimática Fertilización limitada	Mayor tolerancia a contaminantes bacterianos Resistencia antimicrobiana	(Correa <i>et al.</i> , 2010; Ke <i>et al.</i> , 2013; Kuramae <i>et al.</i> , 2011; Lopes <i>et al.</i> , 2011; Ramirez, Craine, & Fierer, 2012)

Recuperado y modificado de Jaramillo & Restrepo, 2017.

3.2 Distrito de Riego la Ramada

Un distrito de riego es un área que proporciona un sistema de irrigación y drenaje constante proveniente de pozos, estaciones de bombeo y/o derivaciones directas de infraestructuras hidroagrícolas; y que desde el siglo XX hace parte integral del desarrollo agrícola y rural en Colombia, como una forma de aprovechamiento para los suelos en la agricultura y el cultivo de hortalizas frescas (Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca, 2010), tanto en épocas de verano como en épocas de lluvia. La Unidad I que es la concerniente al desarrollo de este estudio, principalmente toma aguas de la cuenca media del río Bogotá que, a su vez, las transporta desde la Ciénaga del Gualí y las drena por los canales colectores que la constituyen, para finalmente botarla de nuevo al río Bogotá a través de la estación El Tabaco, cerca de la confluencia del río Balsillas.

Como se mencionó anteriormente el distrito de riego denominado La Ramada, está constituida por diferentes sistemas drenaje:

- Estación de bombeo el Chicú, Canal el Chicú – La Florida
- Canal La Florida – Gualí conformado por los canales “A”, “B” y “C” Tibaitatá y San José
- Canales colectores Venecia, Normandía y la Victoria
- Estación de bombeo El Tabaco
- Estación de Bombeo Mondoñedo
- El azud
- Estación de bombeo El Pino, Canales Acacias, Pedregal Oriental y Occidental

Sistema de riego en Colombia

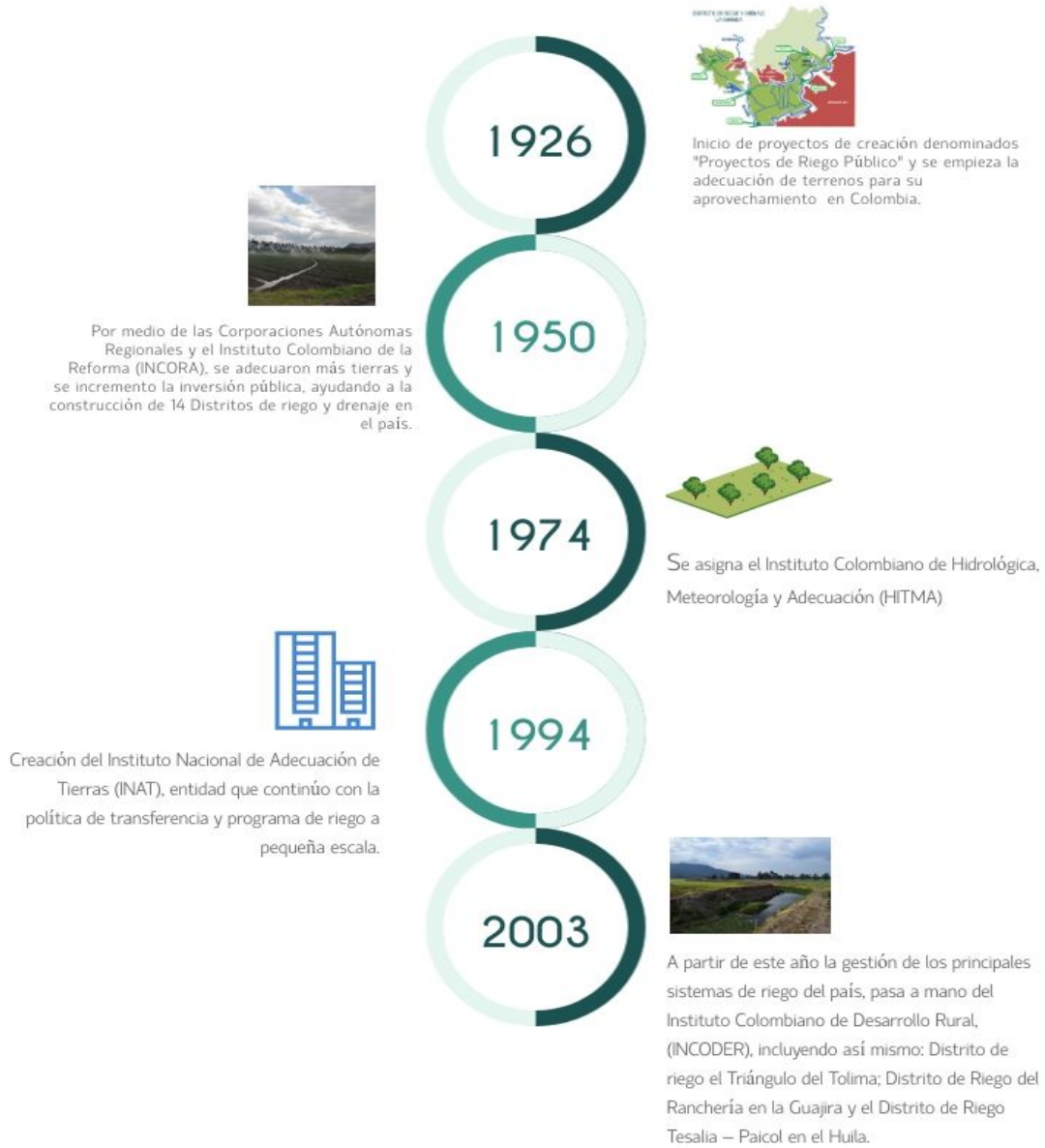


Figura 3-1. Sistema de riego en Colombia a través de los años. Elaboración propia.

Igualmente, cabe resaltar que, durante el proceso de ampliación, funcionan dos unidades más, las cuales corresponden a las etapas de ampliación del Distrito de Riego y Drenaje de la Ramada.

3.3 Reuso de aguas residuales en cultivos de hortalizas

El crecimiento acelerado de la población, ha hecho que los recursos hídricos se utilicen de manera indiscriminada, generando aguas contaminadas y siendo más difícil su disposición y/o tratamiento, ya que, no solo contiene sólidos suspendidos y sedimentados, sino a su vez, albergar patógenos como bacterias, hongos, parásitos y virus siendo potencialmente graves para la salud del consumidor, así como la proliferación de vectores que ayuden a la transmisión de enfermedades. El re uso de aguas, se implementa principalmente en periodos secos como una forma de aprovechamiento en la irrigación de cultivos, siendo una práctica común en países desarrollados como Alemania, Australia, Estados Unidos, Francia, Inglaterra y Polonia, y al ver el auge de su explotación, otros países en vía de desarrollo empezaron a utilizar este método (Silva *et al.*, 2008).

Particularmente, en nuestro país, el re uso de aguas se lleva a cabo para la irrigación de hortalizas frescas de consumo directo (lechuga, espinaca, acelga, apio, entre otras), donde se toman directamente de los canales de riego después de ser captadas del río Bogotá; y que, para su trazabilidad y su adecuado uso, se implementó en el marco legal el Decreto 1594 de 1984, donde se establece lo siguiente:

- El NMP de coliformes totales no deberá exceder de 5.000 cuando se use el recurso para riego de frutas que se consuman sin quitar la cáscara y para hortalizas de tallo corto.
- El NMP de coliformes fecales no deberá exceder de 1.000 cuando se use el recurso para el mismo fin del literal anterior.

Cabe destacar que, estudios realizados en esta zona exponen resultados alarmantes sobre la calidad del agua, debido a que, los parámetros microbiológicos se encuentran

sobreexcedidos de acuerdo a la normativa actual presentando un peligro sanitario para el consumidor como el agricultor (Cárdenas, & Guerrero, 2008; Campos *et al.*, 2018).

La presencia de microorganismos en aguas crudas tratadas ha desarrollado problemáticas a lo largo de los años por ser propagados principalmente por contacto directo entre personas o por contacto indirecto (aire, agua, escorrentía o lixiviación). Los agentes patógenos transmitidos por aguas residuales son difíciles de estimar, debido a diferentes factores como la supervivencia en el medio ambiente, respuesta inmune del huésped y dosis infectiva (Cirelli *et al.*, 2012; Varela & Manaia, 2013). Pero cuando se considera un contagio por el consumo de frutas u hortalizas, los parámetros a estimar son el suelo regado y el método empleado para riego, pero cabe mencionar que la probabilidad aumenta cuando este tipo de alimentos entran en contacto directo con aguas crudas (Song, Stine, Choi, & Gerba, 2006).

El déficit del recurso hídrico, los factores climáticos donde los periodos largos de sequía aumentan y el calentamiento global al cual estamos sujetos, han intervenido para que la población mundial no tenga suficiente agua para satisfacer sus recursos primarios, recurriendo al re uso de aguas residuales en el sector agrícola, que por su alto contenido en materia orgánica resulta económicamente viable para el agricultor (Caovilla *et al.*, 2010; FAO, 2013). Pero autores como Tessaro, Sampaio, & Castaldelli, 2016 indican que no deberían de usarse sin un tratamiento previo, principalmente por los riesgos que pueden generar al medio ambiente y la salud humana, ya que, al contener una gran cantidad de contaminantes orgánicos e inorgánicos, sales y patógenos pueden afectar la productividad de los cultivos (Becerra-Castro *et al.*, 2015).

Por otra parte, productos antibióticos, medicamentos, productos para el cuidado personal, alteradores endocrinos y un sinfín de contaminantes emergentes son también de preocupación, puesto que, se han encontrado en cantidades alarmantes en este tipo de aguas; un ejemplo son los antimicrobianos como ciprofloxacina y sulfametazol, los cuales han demostrado acumularse en suelos y aguas por ser elementos de baja movilidad y tener afinidad por material orgánico, ocasionando problemáticas de contaminación y a la diseminación de genes de resistencia mediante elementos móviles entre las bacterias presentes en estos acuíferos (Dalkmann *et al.*, 2012; Fatta-Kassinos, Kalavrouziotis, Koukoulakis, & Vasquez, 2011; Gozlan, Rotstein, & Avisar, 2013; Muñoz *et al.*, 2009).

3.4 Antibióticos en aguas superficiales

El uso del agua residual como recurso para irrigar, es una práctica constante en el sector agrícola, ya que, puede contener compuestos contaminantes que generan efectos negativos en el ecosistema, puesto que sus altas tasas de transformación/remoción se pueden compensar por su introducción continua en el ambiente (Gil, Soto, Usma, & Gutiérrez, 2012), especialmente en aguas superficiales, cuyos criterios de calidad no se han especificado y las PTAR convencionales no están diseñadas para eliminarlos, siendo motivo de preocupación por sus altos índices en estos efluentes (Pal, Gin, Lin, & Reinhard, 2010).

Los contaminantes emergentes (CE's), presentan características que los hacen difíciles para su degradación/remoción, encontrándose en aguas superficiales, aguas subterráneas, suministros de agua y una gran parte en las plantas de tratamiento, las cuales resultan ser ineficientes, debido a los métodos convencionales que usan para eliminar residuos (Bila & Dezotti, 2007). Dentro de los CE's se encuentran los productos farmacéuticos, los cuales hoy en día están tomando impacto, ya que, al estar presente en estos efluentes, su naturaleza química que puede interactuar con la naturaleza iónica o no iónica del suelo cuando se emplea en irrigación (Ortiz, 2018). De acuerdo, a las transformaciones físico químicas y biológicas de este tipo de productos en el ambiente, se pueden comportar como compuestos neutros, catiónicos, aniónicos o zwitteriónicos con cargas negativas o positivas en función del pH.

Cabe resaltar que, para el desarrollo de este estudio, se tuvo en cuenta, solo el análisis y/o presencia de antibióticos en aguas superficiales para uso agrícola, debido al riesgo de toxicidad que generan estos compuestos en el medio acuático y por las diferentes concentraciones (ng/L) que han venido apareciendo con mayor frecuencia en ríos, lagos entre otros (Huang *et al.*, 2017; Kim, Kam, & Mok, 2015). Por otro lado, la presencia de estos compuestos junto con microorganismos patógenos o nativos de estos efluentes, puede ayudar a la diseminación de genes de resistencia, los cuales al proliferarse en el tracto gastrointestinal y ser eliminados a través de heces, pueden propagar estos mecanismos entre especies bacterianas. De igual modo, suprimiendo los procesos bioquímicos como ciclo de nitrógeno, fósforo y las transformaciones intracelulares de

polihidroxicarbohidratos y glucógeno en etapas óxicas y anóxicas (Wellington *et al.*, 2013; Yi *et al.*, 2017).

Los antibióticos una vez introducidos en el ambiente, se someten a procesos de sorción, desorción y transformación, permitiendo que se acumulen y se logren transportar a través de escorrentía o lixiviación a el agua superficial, donde de acuerdo a la naturaleza química de estos compuestos (polaridad, hidrofobicidad y solubilidad en el agua) impactarán de manera significativa en el ambiente, ya sea, por su pH o al poro del suelo, estas moléculas podrán protonarse o desprotonarse, ayudando a que exista una interacción con la materia orgánica y la superficies minerales reteniéndose en los ecosistemas (Grossberger, Hadar, Borch, & Chefetz, 2014; Miller, Nason, Karthikeyan, & Pedersen, 2016; Park & Huwe, 2016; Vasudevan *et al.*, 2009).

La presencia de antibióticos tanto en el suelo como en el agua, han mostrado una afectación en la estructura microbiana, así como en algas acuáticas, cianobacterias, peces e invertebrados pueden presentar impactos en su crecimiento celular (Guo, Xie, & Chen, 2015). En la vida silvestre se ha encontrado que en ellos pueden acumularse compuestos farmacéuticos en tejidos y son adquiridos principalmente por el consumo de ellos a través de la cadena alimenticia; mientras que en seres humanos su salud se ve en riesgo por el consumo de estos efluentes (Bean *et al.*, 2014; Williams-Nguyen *et al.*, 2016). En la **Figura 3-2**, se puede ver observar cómo los antimicrobianos pueden llegar al ambiente.

En el sector agrícola, el uso de elementos contaminantes (antibióticos, herbicidas, pesticidas) ha contribuido a la propagación y reintroducción de estos en ambientes acuáticos, a través de aguas residuales que se usan para riego y la introducción de biosólidos como fertilizantes, donde sus metabolitos y sus productos de transformación ya hacen parte del ambiente acuífero en países como Europa (Thebo *et al.*, 2017). En cambio, países como China, estudios han demostrado que es el principal productor y consumidor de antibióticos, aumentando la presencia de residuos de fármacos en productos ganaderos, desechos, agua y alimentos de consumo directo, ya que se consideran reservorios vitales y biodisponibles (Tang *et al.*, 2016). Por otro lado, en Colombia y América Latina existen normativas para el uso de antibióticos a nivel agrícola y ganadero, principalmente para tratamiento de enfermedades, profilaxis y promoción de crecimiento, los cuales son supervisados por entes como ICA (Instituto colombiano agropecuario),

INVIMA, INS (Instituto Nacional de Salud) y Ministerio de Salud y Protección Social (Arenas & Melo, 2018) sin embargo, la cuantificación de estos en aguas residuales se ha abordado poco a poco y se ha convertido en una gran problemática por la falta de regulación y por el uso indiscriminado de estos en los sectores agrícolas.

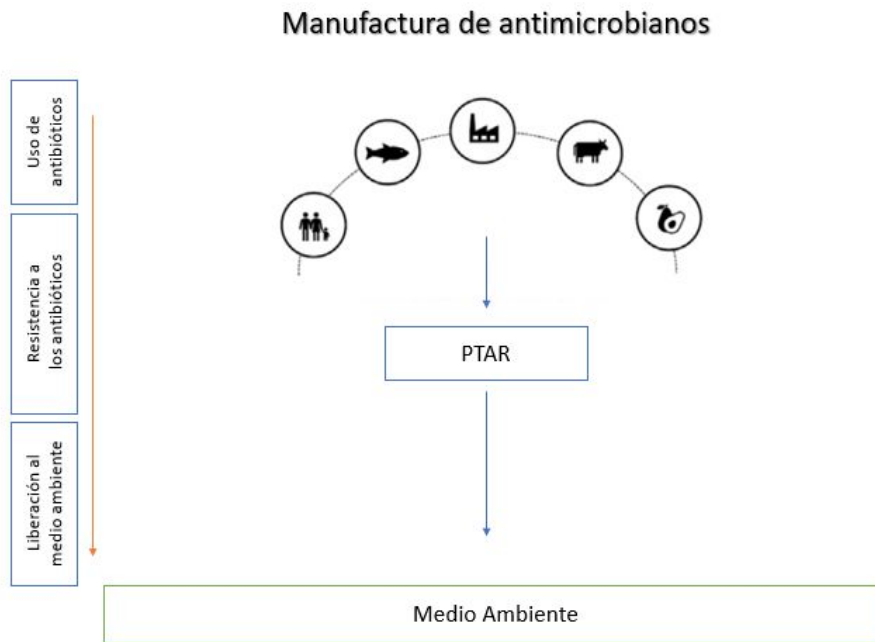


Figura 3-2. Manufactura de los antimicrobianos. Tomado y modificado O 'neill, 2015.

Actualmente, la normativa colombiana presenta un vacío respecto a las regulaciones de productos farmacéuticos en aguas, debido a que no existen límites para su detección en vertimientos, sino solo el monitoreo de parámetros físico químicos y microbiológicos en aguas de uso agrícola, de acuerdo al Decreto 1594 de 1984. La importancia de la detección de antibióticos (CE's) en aguas superficiales y sedimentos, han tomado gran relevancia en los últimos años, por las altas concentraciones de antimicrobianos que se han encontrado en el medio ambiente (Burke *et al.*, 2016) y por la difusión de genes a bacterias comensales y bacterias patógenas (Luprano *et al.*, 2016).

Estudios previos realizados por Hernández *et al.*, 2015, y Cubides, 2018 en la Ramada, demostraron la cuantificación de diferentes concentraciones de antibióticos, antiepilépticos (carbamazepina), antihipertensivos (losartan) y drogas psicoactivas (cocaína, benzoilecgonina, cafeína), siendo un posible riesgo para la irrigación de cultivos, debido a

la exposición continua de los antibióticos con las bacterias presentes en el ambiente, así mismo, porque esto evidencia la mala disposición de estas moléculas a los canales de riego.

3.5 Resistencia a los antimicrobianos

La resistencia a antimicrobianos se considera un fenómeno intrínseco en bacterias, pero el uso excesivo e inadecuado de antibióticos, produce presión selectiva en las bacterias conllevando a la elaboración de diferentes mecanismos de resistencia que permitan su sobrevivencia, requiriendo alternativas más costosas y en ocasiones tóxicas, para así eliminar la infección en el organismo (CDC, 2017).

En el año 2014 la Organización Mundial de Salud, dio a conocer altos niveles de resistencia a antimicrobianos, considerándose de gran importancia los que afectan principalmente el tracto respiratorio y las vías urinarias denominados ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp). Su incremento en los últimos años se relaciona principalmente por la codificación de genes de resistencia, los cuales sufren mutaciones y se insertan por transferencia vertical o mediante eventos que comprenden conjugación, transformación y transducción, por medio de elementos génicos móviles como DNA extracromosomal – plásmidos-, transposones o secuencias de inserción (Rice, 2008).

Así mismo, las bacterias contienen una gran plasticidad genética, que les permite responder a diferentes estímulos que les confieren un peligro para su supervivencia, desarrollando mecanismos para adaptarse a los efectos dañinos que producen los antibióticos. Desde una perspectiva evolutiva, las bacterias utilizan principalmente dos estrategias genéticas para defenderse de los ataques antimicrobianos, **i)** mutaciones en los genes que se encuentran asociados con el mecanismo de acción de los antibióticos y **ii)** la adquisición de DNA foráneo mediante la transferencia horizontal génica (Munita *et al.*, 2016).

i) Mutación genética

El cambio genético es uno de los mecanismos de resistencia que se considera esencial para la evolución y la diversificación genética, puesto que, mínimos cambios en el DNA bacteriano, errores en la replicación por medio de daños oxidativos y alquilación, dan como resultado mutaciones que mantienen su fidelidad genómica en la replicación dentro y entre generaciones, produciendo inicialmente baja tasa de mutación pero que, a largo plazo se ve favorecida por su adaptación (Woodford & Ellington, 2007). La presión selectiva por el uso de antibióticos como β -lactámicos, ha sido también uno de los pilares para la aparición de enzimas (TEM) mutantes, las cuales se derivan de poblaciones susceptibles, preservándose en presencia de moléculas antimicrobianas, debido a que cuando emerge una bacteria mutante resistente, el antibiótico elimina la población susceptible y predominan las bacterias resistentes (Celis Bustos *et al.*, 2017; Thomas & Nielsen, 2005).

ii) Transferencia horizontal génica

La transferencia horizontal de genes, es el principal mecanismo entre bacterias para adquirir resistencia a los antibióticos, como consecuencia, la adquisición de DNA se facilita durante los procesos de replicación (Ali, 2018). Esta maquinaria que está codificada por genes, se puede integrar en plásmidos o elementos móviles extra cromosomales, los cuales tienen una capacidad autónoma para su replicación y expandirse más allá de los clones específicos. Cabe resaltar, que la transferencia de genes de bacterias ambientales a patógenas se puede dar porque comparten el mismo hábitat (Bengtsson-Palme, Kristiansson, & Larsson, 2017). Igualmente, la selección de antibióticos juega un papel importante para el establecimiento de transferencia de genes a su nuevo huésped, por lo tanto, se puede esperar que este tipo de transferencia se presente frecuentemente entre bacterias ambientales en humanos y viceversa, en vista de que, este tipo de microorganismos pueden funcionar como intermediarios o reservorios para que actúen como receptores de genes de resistencia y transferirse para infectar a individuos (Johnning *et al.*, 2013; Porse *et al.*, 2017).

Finalmente, otro tipo de mecanismo eficiente utilizado por bacterias para la diseminación de genes de resistencia son los integrones, que son sistemas de recombinación sitio específico, capaces de reclutar marcos abiertos de lectura en forma de casetes de genes móviles. Los integrones proporcionan la adición de nuevos genes en cromosomas bacterianos junto con la maquinaria necesaria para garantizar su expresión (Manson, Hancock, & Gilmore, 2010).

3.5.1 Mecanismos de resistencia

Los mecanismos de resistencia antimicrobiana constituyen un problema de salud pública a nivel mundial, ya que su alto índice afecta de manera significativa al personal médico y hospitalario para el manejo de las infecciones que son causadas por microorganismos resistentes. Su aumento progresivo hace que los antibióticos de uso común reduzcan el espectro, generando fallas terapéuticas, ya que, el uso erróneo o a veces innecesario, potencia la aparición de cepas resistentes a los antibióticos de mayor uso, por esta razón, es indispensable un buen manejo y una adecuada formulación de los antimicrobianos para evitar que la resistencia se propague. En **Figura 3-3** se pueden observar los mecanismos de resistencia a antibióticos.

Cabe destacar que, los mecanismos de resistencia de antibióticos como sulfonamidas y trimetoprima son más diversos en comparación con los demás, ya que, no solo se incluye alteraciones metabólicas, sino también cambios mutacionales y en la permeabilidad celular como síntesis de las nuevas enzimas que resultan ser resistentes a antibióticos (Pazda, Kumirska, Stepnowski, & Mulkiewicz, 2019).

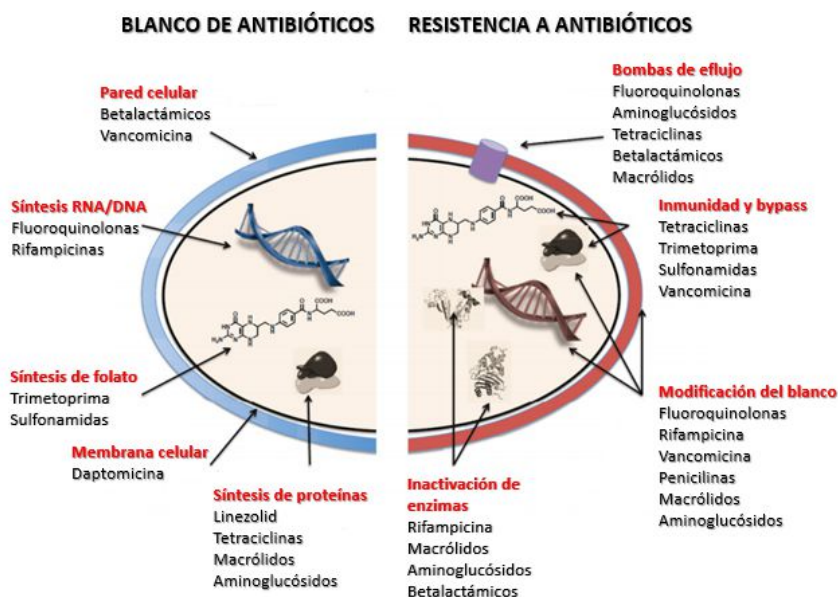


Figura 3-3. Blanco de los antibióticos y ejemplos de mecanismos de resistencia para antibióticos seleccionados. Tomado y modificado Pazda, Kumirska, Stepnowski, & Mulkiwicz, 2019.

Actualmente, el incremento de infecciones a nivel hospitalario como en la comunidad va en aumento, especialmente las que son causadas por bacterias Gram negativas, debido principalmente a la generación o adquisición de mecanismos de resistencia que ha comenzado a diseminarse por el uso indiscriminado de antibióticos y la falta de vigilancia y control en los diferentes sectores.

3.5.2 Mecanismos de resistencia de Bacterias Gram negativas

Este tipo de bacterias presentan un amplio conjunto de mecanismos de resistencia, ocasionando mayores tasas de fracasos terapéuticos, aumento en la mortalidad y mayores costos por prolongación de estancia hospitalaria, por su capacidad de adaptación y selección frente a los antibióticos suministrados. Estas bacterias tienen varios mecanismos de resistencia a antibióticos, especialmente los betalactámicos, los cuales mediante la producción de betalactamasas rompen el anillo β -lactámico presente en los antibióticos alterando su mecanismo de acción y contribuyendo a su supervivencia. Debido a la presencia de estas enzimas y dependiendo del sitio de donde se ubiquen los genes, ya sea, cromosómico o plasmídico pueden dar lugar a su expresión de tipo inducible o

constitutiva (Marrero-moreno *et al.*, 2017). De acuerdo con esto, los mecanismos de resistencia se pueden categorizar en cuatro clases:

a. Modificación enzimática del antibiótico

Las bacterias expresan enzimas capaces de modificar la estructura de los antibióticos para así perder su funcionalidad. Igualmente, se puede lograr a través de múltiples vías bioquímicas (Munita *et al.*, 2016; Tafur & Villegas, 2008).

b. Bombas de eflujo

Operan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, con lo cual evitan que llegue a su sitio de acción (Vila, Martí, & Sánchez-Céspedes, 2007).

c. Cambios en la permeabilidad de la membrana externa

Se da principalmente por cambios en la bicapa lipídica, principalmente por las porinas que, debido a las modificaciones en su conformación, puede llevar a que no permita el paso de agentes en el espacio periplásmico (Vila *et al.*, 2007).

d. Alteraciones en el sitio de acción

Se presentan cambios estructurales en los sitios de acción de los antibióticos, a nivel de proteínas, (PBP - Proteínas de Unión a Penicilina) específicamente en los β -lactámicos (Cavaco *et al.*, 2008). Este mecanismo es empleado principalmente por las bacterias Gram positivas.

El tipo de enzimas que se presenta con mayor frecuencia en bacterias Gram negativas, son las betalactamasas de espectro extendido (BLEES), las cuales actúan sobre el antibiótico, ayudando a proteger su pared celular principalmente el peptidoglicano. Su aparición surgió de mutaciones puntuales por genes bla *SHV*, bla *TEM*, bla *CTX-M* y tipo OXA, estas a diferencia de las anteriores, son de carácter plasmídico, facilitando su diseminación (Paola *et al.*, 2016). Otras enzimas que revisten de importancia clínica son las betalactamasas de tipo AmpC, presentes en algunas enterobacterias y en bacterias

Gram negativas no fermentadoras; las cuales pueden ser adquiridas a través de plásmidos o pueden ser codificadas por genes cromosómicos.

Por otro lado, las betalactamasas de tipo carbapenemasas se pueden considerar un tipo muy versátil de enzimas, debido a que su hallazgo resulta ser plasmídico o cromosómico, observando que las bacterias productoras de este tipo de enzimas hidrolizan prácticamente todos los β -lactámicos y también resultan ser generalmente resistentes a antibióticos como imipenem, meropenem, doripenem y ertapenem (Miao *et al.*, 2019; Nordmann & Poirel, 2014), los cuales pueden estar asociados a genes como Clase A: KPC, Clase B: VIM, NDM e IMP, Clase D: OXA 48 y sus variantes OXA 162 y OXA 181), las cuales se presentan en la **Tabla 3-3**:

Tabla 3-3 Clasificación de carbapenemasas

Enzimas	Microorganismos	Localización genética
Sme, IMI, NmcA	<i>Serratia marcescens</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	Cromosomal
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Enterobacter sp.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Citrobacter freundii</i>	Plasmídica
GES	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Plasmídica
L1, Ccra, CpHa, BcII	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Bacteroides fragilis</i> <i>Aeromonas hydrophilia</i> <i>Bacillus cereus</i>	Cromosomal
IMP, SPM, SIM, VIM, GIM VIM, GIM	<i>Serratia marcescens</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia coli</i>	Plasmídica
OXA (OXA-48)	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Plasmídica, Cromosomal

Tomado y modificado Fica, 2014; Morosini *et al.*, 2012.

En particular, este tipo de genes de resistencia a carbapenémicos son transportados principalmente por plásmidos conjugativos, facilitando su transferencia horizontal entre

especies bacterianas y a su vez, puede implicar otro mecanismo de resistencia como la combinación de disfunción de porina con hiperproducción de AmpC o BLEE (Logan & Weinstein, 2017), capaz de propagarse, a través, de expansión clonal.

3.5.3 Herramientas para el diagnóstico microbiológico

Resulta evidente que los avances tecnológicos a través de los años han permitido el desarrollo de nuevas técnicas microbiológicas. La amplia utilización de estas nuevas herramientas es el resultado de su gran sensibilidad, especificidad, velocidad y disminución de costo, en otros términos, los laboratorios serán capaces de proveer resultados estandarizados y reproducibles en menor tiempo de las muestras que se analizan (Hervé, 2015).

Hoy por hoy, la identificación bacteriana emplea métodos convencionales que se basan en las características fenotípicas (morfología, propiedades metabólicas y bioquímicas); ya que tanto su ejecución como los costos los hacen más asequibles. Por el contrario, los métodos genotípicos se exceptúan y suelen realizarse para las bacterias de difícil identificación por metodología convencional.

No obstante, el cultivo continúa siendo el Gold estándar para el aislamiento bacteriano, ya que, permite su identificación y la determinación del perfil de sensibilidad a los diferentes antimicrobianos y asimismo posibilita la aplicación de marcadores epidemiológico.

3.6 Identificación y detección bacteriana

Para la identificación y detección bacteriana, se han utilizado a través de los años, diferentes técnicas rutinarias que con el tiempo han venido avanzado gracias a la tecnología actual. Este tipo de pruebas incluyen aspectos fisiológicos (características macroscópicas, morfología celular, composición de pared para diferenciar microorganismos Gram positivos, Gram negativos y Ácido alcohol resistente), crecimiento en diferentes atmósferas de incubación, perfil bioquímico, uso de varios tipos de medios de cultivo ya sean básicos, de enriquecimiento, selectivos, diferenciales o cromogénicos; éstos últimos detectan distintas enzimas producidas por los microorganismos hidrolizando el sustrato y liberando un compuesto cromógeno. La especificidad llega a ser tan elevada que en ocasiones soslaya la realización de pruebas confirmatorias para identificación, ya

que excluyen pruebas tradicionales como los sustratos bioquímicos y las mezclas entre colonias (Sakhno, NgGunar, 2016). A nivel clínico, este tipo de metodologías han tomado más importancia, debido a que no solo la identificación resulta ser prioritaria, sino también los perfiles de susceptibilidad, por ello, algunos de estos Chromagares están diseñados especialmente para la detección de bacterias resistentes a algún fármaco tras cultivar directamente el espécimen o un cultivo de vigilancia.

En contraste, técnicas de alta especificidad y sensibilidad como el uso de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) proporcionan datos genómicos y ayudan a una identificación más rápida frente a los habituales debido a que permiten una mayor precisión o diferenciación intra especie. Éstas pruebas pueden detectar los genes que están implicados en la codificación de mecanismos de resistencia, mientras que los métodos fenotípicos solo pueden inferir una probable resistencia (Schwartz *et al.*, 2003).

3.7 Perfil de susceptibilidad antimicrobiana

Como se mencionó anteriormente en la parte clínica, los métodos de susceptibilidad son requeridos para determinar la resistencia que pueden tener algunas bacterias a los antibióticos que se usan de rutina para las infecciones; lo que ha permitido evidenciar el incremento en la prevalencia en niveles de resistencia así como su distribución geográfica. Comités internacionales como CLSI (Instituto de estándares clínicos y de laboratorio), EUCAST (Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos) se encargan de determinar las concentraciones mínimas inhibitorias, fundamentados en los mecanismos farmacocinéticos y farmacodinámicos de resistencia, desafiando grupos de bacterias frente a antibióticos específicos (Váradi *et al.*, 2017) para emitir guías, que puedan ser utilizadas e interpretadas por los clínicos.

3.8 Identificación fenotípica

Los métodos fenotípicos son aquellos que permiten mediante expresiones proteicas, determinar e identificar géneros bacterianos por test bioquímicos, los cuales contienen en su batería fuentes de carbono, nitrógeno y metabolitos que son utilizados por la bacteria para su desarrollo.

3.8.1 Test bioquímicos

Para la detección de patógenos es indispensable el uso de medios de cultivo diferenciales que tienen indicadores bioquímicos (pH, azúcares, metabolitos) y/o selectivos, los cuales ayudan a indicar la presencia de microorganismos patógenos (Lagier *et al.*, 2015). Dentro de los sistemas comerciales bioquímicos típicos, se encuentra la incorporación de productos que acidifican o fermentan el medio como azúcares, igualmente, aminoácidos y enzimas que permiten la identificación bacteriana. Actualmente, la inoculación y lectura de estos test se puede realizar de forma automatizada, reduciendo el tiempo de identificación de 2 a 3 horas y evitando errores durante el proceso (Buszewski *et al.*, 2017).

3.8.2 Medios Cromogénicos

El uso de medios de cultivo ha sido vital desde décadas anteriores para lograr el crecimiento bacteriano. Hoy en día su uso es fundamental para el diagnóstico clínico, ya que, su empleo sirve para el screening de patógenos que han adquirido algún tipo de resistencia antimicrobiana como Enterococos vancomicina resistente, Gram negativos con resistencia a carbapenémicos y la detección de betalactamasas de espectro extendido (Ravea *et al.*, 2019), mediante actividad enzimática. El avance en nuevos métodos para la rapidez e identificación microbiana, han permitido que este tipo de técnicas tradicionales, se complementen con sustratos enzimáticos que los hacen tanto diferenciales como selectivos, debido a que, el uso de inhibidores o antibióticos impiden el crecimiento de bacterias no deseadas, con el objetivo que las que crezcan puedan colorearse debido a su metabolismo mediado por los sustratos que contiene el medio (Perry, 2017).

Particularmente, en el caso de microorganismos que contienen BLEES (betalactamasas de espectro extendido) y de carbapenemasas, se han creado agares cromogénicos, que pueden detectar rápida y precisa las bacterias productoras de estas enzimas, mediante la incorporación de cefalosporinas (ejemplo ceftazidime) e inhibidores para el crecimiento de bacterias Gram positivas o Gram negativas, como se puede observar en la **Figura 3-4** (Frickmann, Masanta, & Zautner, 2014).

En el caso puntual de Enterobacterias que adquieren enzimas carbapenemasas como *IMP*, *NDM*, *VIM*, *KPC* y *OXA 48*, por medio de plásmidos se emplean para su detección

cromorientadores con suplementos como meropenem o ertapenem (Tängdén & Giske, 2015).

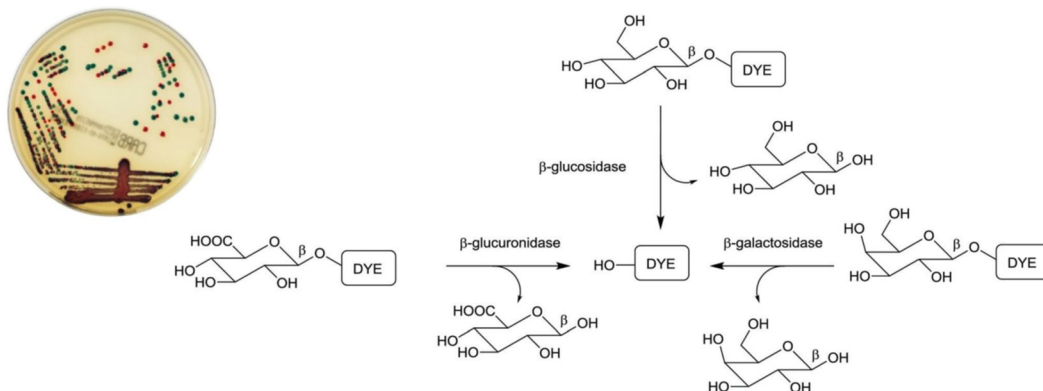


Figura 3-4. Medio Cromogénico (ChromID CARBA) empleando una combinación de sustratos cromogénicos para la detección de carbapenemasas en *Enterobacteriaceae*. Las colonias rojas pertenecen a *E. coli* y verde azulosas a *K. pneumoniae* (imagen cortesía BioMérieux).

3.8.3 Herramientas de Diagnóstico microbiológico

Por otro lado, los sistemas automatizados en la nueva era han tomado fuerza para ser empleados de manera rutinaria en los laboratorios de diagnóstico e investigación, debido principalmente a la rapidez y confiabilidad en los resultados que manejan, ya que, en comparación con otras herramientas, resulta ser más fácil y menos erróneo a la hora de la interpretación. De acuerdo con esto, se pueden encontrar en la actualidad diferentes alternativas como se muestran a continuación:

a) MicroScan

Es una herramienta que permite la identificación y susceptibilidad bacteriana que utiliza como método de detección turbidimetría, mediante el uso de paneles abiertos, donde se emplea un inóculo de 0.5 Mc Farland para bacterias de fácil crecimiento el cual es dispensado en 96 pocillos que contienen diferentes concentraciones de antibióticos. Mediante el software que emplea el equipo, se puede detectar la MIC (Concentración mínima inhibitoria) de las cepas evaluadas y compararlas con las de referencia para así establecer el perfil de sensibilidad (Sainz, Basile, & Zandanel, 2017). Igualmente, esta tecnología utiliza un sistema de

fluorescencia para la detección de los sustratos que metabolizan las bacterias y lograr su fácil identificación.

Por otro lado, MicroScan ofrece tres paneles para emplear de acuerdo a la necesidad del estudio:

- **ID** (Identificación).
- **AST** (Susceptibilidad).
- **ID/AST** (NC66 Bacterias Gram negativas, PC34 Bacterias Gram positivas y YST Levaduras).



Figura 3-5. Montaje de MicroScan para la identificación y evaluación de la susceptibilidad microbiana. Tomado y modificado Coulter, 2011.

La gran desventaja que tiene este sistema son los diferentes errores que se pueden presentar por una inadecuada o deficiente inoculación por parte del analista, ya que, al tener un montaje manual preliminar, aumentan los errores post-analíticos presentando para el caso de susceptibilidad falsas resistencias o falsas susceptibilidades, haciendo que el proceso no se reproduzca y los resultados que arrojen puedan ser invalidados o inconsistentes.

b) VITEK

Es un sistema cerrado empleado tanto para la identificación de microorganismos como para evaluar el perfil de susceptibilidad de las cepas aisladas a nivel clínico, industrial y ambiental; utiliza una serie de tarjetas que, de acuerdo con el género bacteriano se debe emplear:

- **GN** (Bacilos Gram negativos fermentadores o no fermentadores).
- **GP** (Bacilos Gram positivos fermentadores o no fermentadores).
- **YST** (Levaduras).
- **BCL** (Bacilos Gram positivos formadores de esporas).

Mediante un sistema óptico de transmitancia permite la interpretación de reacciones usando diferentes longitudes de onda en un espectro visible, es decir, mide la turbidez o los productos coloreados del metabolismo del sustrato (pruebas bioquímicas para la identificación) y mediante una base de datos donde se encuentran colecciones de cepas caracterizadas de diferentes ámbitos, logra identificar una variedad de microorganismos (Pincus, 2010).

En cambio, para la evaluación de la susceptibilidad, los aislamientos de las bacterias se inoculan en una serie de pocillos que contienen diferentes concentraciones de antibióticos de acuerdo a la tarjeta empleada de manera automatizada, VITEK controla el crecimiento mediante turbidez de cada uno de ellos hasta detectar una cantidad mínima de crecimiento bacteriano (US Environmental Protection Agency Office of Pesticide, 2016) y relacionándolo mediante la MIC de referencia, obteniendo a las 18 horas los mecanismos de resistencia que poseen las bacterias testeadas. Una gran ventaja de esta tecnología es el sistema cerrado que emplea y el efecto inóculo no se ve afectado.

3.9 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas ayuda a identificar y cuantificar moléculas mediante el análisis de las relaciones masa carga de iones moleculares, principalmente se ioniza las células microbianas con pulsos de laser cortos y se acelera las partículas en un sistema vacío utilizando un campo eléctrico, donde se obtienen “huellas digitales” en forma de perfil de espectros, que se especifican para cada microorganismo. Este espectro se compara con una base de datos existente, lo que resulta en su identificación por un programa automatizado (Hou, Chiang-Ni, & Teng, 2019).

En la **Figura 3-6**, se observan las diferentes técnicas empleadas para la identificación microbiana, desde las más tradicionales hasta las más avanzadas que se utilizan en los laboratorios de microbiología:

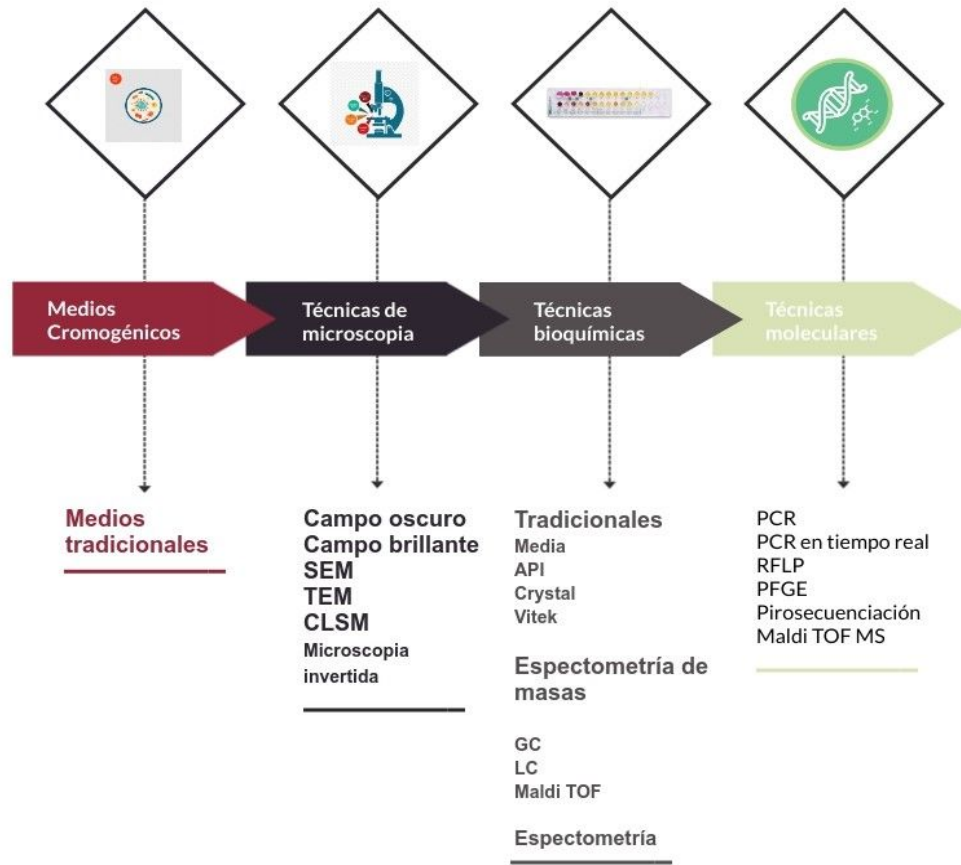


Figura 3-6. Métodos de identificación microbiana: medios cromogénicos y microscópicos, técnicas bioquímicas y moleculares. Tomado y modificado Franco-Duarte *et al.*, 2019.

El análisis proteómico, tiene una gran ventaja y es la poca muestra que se necesita para la identificación, además de utilizar diversas fuentes; por un lado, a nivel celular, péptido o por un complejo de proteínas (Aebersold & Mann, 2003). El análisis proteómico se enfatiza además en la calidad, como la identificación o determinación de la cantidad de proteínas de la muestra. Para llevar a cabo este proceso, inicialmente se identifica y luego se caracteriza; para este último, se pueden emplear:

- **MS Top-down** (Proteínas intactas).
- **MS Botto-mup** (Digestión de proteínas, analiza la mezcla de péptidos).

Así mismo, existen diversas estrategias para caracterizar modificaciones de proteínas donde se incluyen glicosilación, fosforilación, puentes disulfuro, acetilación, ubiquitinación y metilación (C. Xu *et al.*, 2019). Cabe resaltar, que para la industria farmacéutica y biotecnológica la glicosilación es una modificación para las proteínas recombinantes, ayudando a su estabilidad y solubilidad.

4. METODOLOGÍA

4.1 Área de estudio

La zona de estudio se sitúa en la Sabana Occidental de Cundinamarca, específicamente en el Distrito La Ramada (Ver **Figura 4-1**), la cual está comprendida por un área de riego de 18000 hectáreas y se ubica entre los municipios de Mosquera, Funza, Madrid, Tenjo, Cota y Bojacá. Esta área geográfica comprende áreas agrícolas, agropecuarias y zonas tanto industriales como domésticas (Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca, 2010). Los canales que están delimitando este Distrito son: Estación de bombeo Chicú, Canal La Florida, Canales “A”, “B” y “C”, Tibaitatá y San José, Canales colectores Venecia, Normandía y La Victoria y estación de bombeo para drenaje El Tabaco, que corresponden a la Unidad I; la Unidad II, se contemplan etapas de ampliación por la necesidad de establecer un sistema hidráulico de manejo ambiental y de control de inundaciones.

Para la realización de este trabajo, se tuvo en cuenta los datos recolectados con anterioridad de la Unidad I del Distrito de Riego la Ramada, Cundinamarca por parte del grupo RESA (Resiliencia y Saneamiento Ambiental) de la Universidad Nacional de Colombia e información de los trabajos por parte del equipo del laboratorio LIA que han venido trabajando en esta zona durante un largo período de tiempo (Argüello & Bustos, 2018; Cubides, 2018; Calle, 2005; Chacon, 2003; Torres, 2004) y principalmente, porque las aguas captadas para la irrigación de cultivos de la Ramada, se captan de la cuenca media del río Bogotá, las cuales llegan a la Ciénaga el Gualí para una depuración, y atraviesan la troncal de Occidente, alimentando inicialmente los canales A y B, para posteriormente irse drenando a través de los siguientes canales, para finalmente llegar a la estación de Tabaco, donde se recolectan las aguas de la Unidad I y nuevamente devolverlas al río Bogotá.

Por otro lado, se obtuvo información de la CAR (Corporación Autónoma Regional) para observar cómo ha venido variando la calidad del agua en esta región y así mismo, establecer los puntos de muestreo.

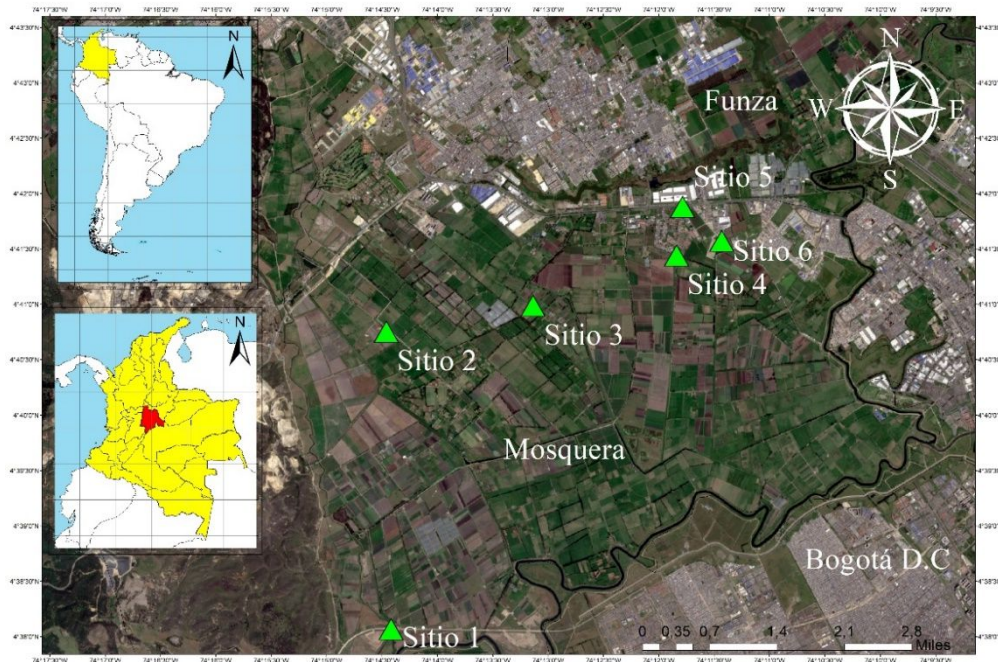


Figura 4-1. Zona de muestreo, Distrito de Riego la Ramada.
Fuente: Sánchez, 2021

- **Sitio 1, Tabaco:**

Se encuentra ubicado en las coordenadas: Latitud 4.634444° , Longitud -74.240309 . Es uno de los puntos donde se concentra la mayor cantidad de cultivos de hortalizas de la Sabana Occidental de Cundinamarca; en este lugar se sitúan canales de riego, los cuales son alimentados por aguas provenientes del Río Bogotá, es considerado un sector de producción netamente agrícola, que abastece de hortalizas a diferentes partes del país (Ver **Figura 4-2**)



Figura 4-2. Zona de producción agrícola de hortalizas, El Tabaco.
Fuente: Sánchez, 2021.

Se escogió como uno de los puntos de muestreo del proyecto, debido a que pertenece al Distrito de Riego la Ramada y por el impacto que tiene por el uso de aguas superficiales para uso agrícola.

- **Sitio 2, Canal Venecia:**

Es uno de los canales de agua utilizados para irrigación agrícola, que se encarga de conducir aguas hasta el Distrito de Riego la Ramada. Se encuentra ubicado en las coordenadas: Latitud 4.679243°, Longitud -74.241064°. Esta zona al igual que la del Sitio 1, se caracteriza por la presencia de actividades agrícolas junto con la crianza de ganado vacuno para la producción láctea (Ver **Figura 4-3**).



Figura 4-3. Zona de actividad agrícola, Canal Venecia. Fuente propia.

Es un área de importancia para el estudio, debido a que, en este punto al recibir descargas de aguas residuales domésticas, genera un problema de salud pública, ya que, este tipo de efluentes superficiales se utilizan para irrigar los cultivos de la zona, no solo afectando el consumidor, sino a su vez al suelo por la cantidad de contaminantes que pueden traer consigo estos vertimientos, debido a que pueden afectar el crecimiento de los cultivos.

- **Sitio 3, Centro agropecuario Marengo:**

Es el centro de investigación de la Universidad Nacional de Colombia, este se encuentra ubicado en el Km 14 de la carretera Central de Occidente que comunica Bogotá con el municipio de Mosquera, Cundinamarca (Latitud 4.683125°, Longitud -74.218966°). Cuenta con 97,4 hectáreas de extensión para el desarrollo de actividades agrícolas y agropecuarias. Esta zona se seleccionó, para dar continuidad a los estudios anteriores (Cubides, 2018) y por ser un sitio donde se utiliza agua para el riego de cultivos provenientes del Distrito de Riego (Ver **Figura 4-4**)



Figura 4-4. Centro de investigación agrícola y agropecuario de la Universidad Nacional de Colombia, Marengo. Fuente: Sánchez, 2021.

Nota: Los tres primeros sitios se escogieron principalmente por la concentración neta agrícola que se evidencia, junto con la crianza de animales (vacuno, porcino y avícola) en el centro de experimentación del sitio 3 y así mismo, por la poca influencia de actividades antropogénicas en estas áreas y así mismo, por dar continuidad a los estudios previos realizados en la zona.

- **Sitio 4, Barrio Villa Cety:**

Este barrio se encuentra ubicado en el municipio de Mosquera, Cundinamarca (Latitud 4.690720, Longitud -74.197369°), el cual, durante años se ha observado un incremento en la población, como la construcción de colegios y zonas residenciales, las cuales se mezclan con la producción de actividades agrícolas, así mismo, se pudo evidenciar la descarga de vertimientos de aguas domesticas directamente a los canales de riego (Ver **Figura 4-5**)



Figura 4-5. Zona de muestreo, Barrios Villa Cety. Fuente: Sánchez, 2021.

Es un punto de interés, por la influencia negativa que tienen estas descargas directas a los canales de riego, ya que, los pocos cultivos encontrados allí, se irrigan con estas aguas, siendo una problemática por la carga contaminante tan alta que contiene.

- **Sitio 5, Entrada a barrios:**

Se encuentra ubicado en la carretera Central de Occidente (Latitud 4.698042°, Longitud -74.196457) que comunica Bogotá con el municipio de Mosquera, Cundinamarca. Principalmente, lo alimenta las aguas provenientes de la ciénaga el

Gualí. Es un punto de muestreo importante, ya que, se quería observar la calidad de las aguas de este canal antes de su ingreso a el sitio 4 y el sitio 6, es decir, se evaluó antes de ser intervenida por las descargas residuales domésticas y agroindustriales (Ver **Figura 4-5**).



Figura 4-6. Zona de muestreo, Entrada a Barrios. Fuente: Sánchez, 2021.

- **Sitio 6, Barrio El Lucero:**

Situado en el municipio de Mosquera (Latitud 4.692900°, Longitud -74.190544°), con una alta influencia de sectores industriales, agrícolas y residenciales. Esta área, representa problema debido al gran aumento de la población en esta zona, ya que, al estar ubicados los canales de riego de la Unidad I del Distrito de la Ramada, hace que sea vulnerable a contaminaciones externas por parte de vertimientos residuales generados allí (Ver **Figura 4-7**)



Figura 4-7. Zona de actividades agroindustriales y residenciales, Barrio el Lucero. Fuente: Sánchez, 2021.

El principal interés de este sitio de muestreo, fue observar cómo al ser una zona agroindustrial y residencial se ve influenciada por las descargas puntuales de aguas residuales generadas en esta zona, siendo empleadas para irrigar cultivos y poder seguir monitoreando la calidad del agua que se ha visto afectada por el desarrollo de actividades antropogénicas.

Para la selección de las dos campañas de muestreo, se tuvo en cuenta el promedio de las precipitaciones desde el año 2001 hasta el año 2019, donde se seleccionó una temporada seca, la cual estuvo comprendida entre los meses de Julio a Agosto (10 muestreos) y una temporada lluvia comprendida por los meses Junio, Octubre y Noviembre del año 2019 (6 muestreos), donde se recolectaron un total de 16 muestreos en los 6 sitios seleccionados con anterioridad, como se observa a continuación, en la **Tabla 4-1**:

Tabla 4-1 Cronograma de muestreo en época seca y época lluvia.

Puntos de muestreo	Época	
	Fecha de muestreo Temporada Seca	Fecha de muestreo Temporada Lluvia
	02/07/2019	06/06/2019
	26/07/2019	11/06/2019
	31/07/2019	18/10/2019
Sitio 1.	08/08/2019	19/10/2019
Sitio 2.	12/08/2019	12/11/2109
Sitio 3.	31/08/2019	14/11/2019
Sitio 4.	04/09/2019	
Sitio 5.	12/09/2019	
Sitio 6.	15/09/2019	
	20/09/2019	

Elaboración propia.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Recolección de muestras

Se recolectaron un total de 96 muestras por sitio, tanto en temporada seca, como en temporada lluvia. Se realizó la toma de muestra siguiendo el protocolo del LIA-PT-002, el cual establece los parámetros de calidad para su adecuada recolección (elementos de bioseguridad, volumen de las muestras, recipientes limpios y estériles, temperatura de conservación de la muestra, transporte y análisis). Igualmente, se pudo analizar parámetros *in situ* como pH (SM 4500 H+ B), Conductividad (SM 2510 B), Temperatura (SM 2550 B) y Oxígeno disuelto (SM 5210 B); mientras que en el laboratorio se analizaron otros parámetros como fósforo (SM 4500 P), nitrógeno (SM 4500 N), sulfatos (SM 4500 SO₄²⁻), cloruros (SM 4110 B) y sólidos disueltos (SM 2540 D).

Se tomaron muestras para los siguientes análisis fisicoquímicos: DQO por (SM 5220 C) con termorreactor Spectroquant TR 420 y titulador automático Mettler Toledo DL 50, DBO₅ por (SM 5210 B, 4500-OG) y COT (SM 5310) y para el análisis microbiológico de la detección de microorganismos como *Escherichia coli* y *Coliformes totales* se tuvo en cuenta la técnica de filtración por membrana por Chromocult® (ISO 9308-I). Cabe destacar

que al principio del estudio se establecieron criterios de selección para su aislamiento, es decir, que fueran bacterias Gram negativas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, que presentarán un crecimiento masivo en chromorientadores (agares selectivos con antibióticos betalactámicos) y, por último, que fueran de interés clínico.

Para su procesamiento, se tomaron 200 mL de agua superficial en frascos de vidrio previamente esterilizados y marcados, los cuales estuvieron acompañados con la información de la cadena de custodia correspondiente. Las muestras fueron conservadas en neveras portátiles a 4°C hasta llegar al laboratorio de ingeniería ambiental de la Universidad Nacional de Colombia, donde se almacenaron en neveras (SM 1060), para posteriormente ser analizadas de acuerdo con los estándares para análisis de aguas. Para el análisis de antibióticos en agua superficial para uso agrícola, se tuvo en cuenta el siguiente procedimiento:

4.2.2 Análisis y extracción de antibióticos

Para la determinación de los antibióticos de las muestras de agua para irrigación agrícola, se llevó a cabo, previamente la preparación de patrones de los antibióticos para su detección, donde inicialmente se tomaron 100 mL de agua desionizada por triplicado en balones aforados de 100 mL y a cada réplica se le agregó el patrón de antibióticos para ajustar una concentración final de 50 ng/ Kg. Una vez agregados los patrones se dejaron estabilizando por 24 horas para que la matriz absorbiera el antibiótico (Biel-Maeso, Corada-Fernández, & Lara-Martín, 2017; EPA, 2007). Transcurrido este tiempo se procedió a realizar la recuperación de los antibióticos con la metodología propuesta y descrita por Hernández *et al.*, 2015:

- Inicialmente, se hizo un pre acondicionamiento de los cartuchos OASIS HLB (60mg/3cc), con 6 mL de agua Milli-Q y 6 mL de metanol. Posteriormente, se pasó un volumen de 100 mL de cada una de las 96 muestras que previamente fueron centrifugadas 15 minutos a 3500 rpm, en cartuchos mediante un filtrado por vacío y se filtraron en un poro de 0.45 μm , con el fin de retirar los sólidos suspendidos que se encontraban en el agua.

- Posteriormente, los analitos se eluyeron con 5 mL de metanol y fueron evaporados en un baño maría a una temperatura de 35°C.
- Finalmente, los extractos se reconstituyeron a un volumen final de 1 mL con metanol y se transfirieron a viales de cromatografía, luego se hizo análisis por LC-MS / MS.

4.2.3 Aislamiento de *Coliformes totales* y *Escherichia coli*

Para el aislamiento de bacterias, se empleó la técnica Chromocult® (ISO 9308-I), la cual consiste en pasar 100 mL de la muestra por un filtro de membrana que va conectada a una bomba de vacío; para el desarrollo del estudio, previamente se realizaron diluciones seriadas (10^1 a 10^7) para lograr eliminar solidos suspendidos presentes en el agua. Finalmente, se llevaron a incubar 24 horas a 37°C en agar Chromocult, el cual es un medio de cultivo cromogénico diferencial para el análisis microbiológico de *Escherichia coli* y *Coliformes totales* en muestras de agua (Merck Millipore, 2014).

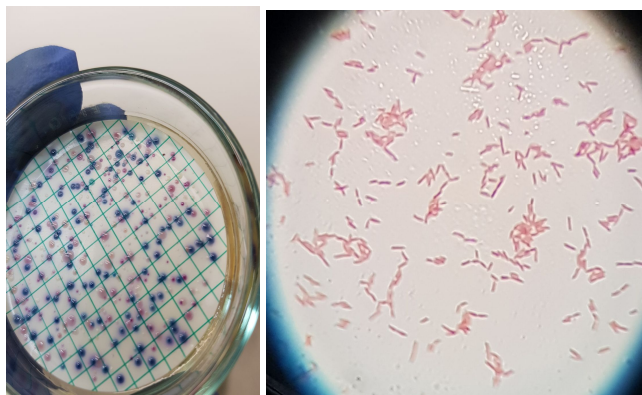


Figura 4-8. Imagen representativa de la identificación de Bacterias Gram negativas por el método Chromocult.

Para seleccionar las cepas de interés se escogieron aquellas que cumplieran con características microscópicas al ser Bacilos Gram negativos y características macroscópicas como morfología, textura, tamaño y color (Anexo 3). Para purificar se hicieron pases en agar MacConkey, un medio de cultivo selectivo para observar la morfología de las colonias y que no presentarán algún tipo de contaminación.

4.2.4 Selección de bacterias con posible resistencia

Para la selección de las cepas, se tomaron en cuenta los criterios de selección mencionadas en el numeral 4.2.3. Posteriormente, se realizaron pases en medios de cultivo cromogénicos selectivos (Agar CARBA CHROMID®, Biomérieux y Agar ESBL CHROMID®, Biomérieux), para determinar si las enterobacterias aisladas tenían resistencia a antibióticos betalactámicos. Aquellas que resultaran tener crecimiento masivo, y un cambio de color en los cromorientadores, se seleccionaron para realizar su posterior análisis de resistencia por medios automatizados. Para evaluar el desempeño de los cromogénicos se emplearon cepas control como *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 positiva para ESBL (Betalactamasas de espectro extendido) y *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA1705 positiva para KPC productora de carbapenemasas. (Ver **Figura 4-9**).



Figura 4-9. Cepas control *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 positiva para ESBL y *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA1705 positiva para KPC.

4.2.5 Identificación bacteriana

Para la selección de las cepas, se tuvo en cuenta el crecimiento masivo en los Chomorientadores tipo ESBL y CARBA, y por la coloración presentada en estos medios de cultivo. De acuerdo con esto, las cepas que presentaron estas características, posteriormente fueron sembradas en agares de enriquecimiento (Agar Sangre, Biomérieux) durante 18 horas a 37°C, con el fin de aislar las colonias e identificarlas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, teniendo en cuenta el procedimiento

establecido por VITEK® MS, Biomérieux (Anexo 5). Estos análisis se llevaron a cabo gracias a la colaboración de la Doctora Rocío del Pilar Morales Delgado.

4.2.6 Determinación del perfil de resistencia

Las cepas seleccionadas de acuerdo a los criterios de selección y del numeral 4.2.5, se les determinó el perfil de resistencia mediante la técnica automatizada VITEK® 2 COMPACT, la cual se llevó a cabo en las instalaciones de Agrosavia gracias a la colaboración de la Doctora Pilar Donado. Esta técnica consistió en preparar una suspensión bacteriana con 3 mL de solución salina al 0.45%, donde se debe comparar con el estándar 0.5 McFarland con DENSICHEK® Plus, en el caso de bacterias Gram negativas se ajustó la turbidez McFarland en un rango de 0.5 a 0.63. Posteriormente, se agregaron 3 mL de solución salina a otro tubo, al cual se le transfirieron 1.45µl mediante una micropipeta calibrada de la suspensión inicial; luego cada tubo se coloca en una estación Smart Carrier, junto con las tarjetas de susceptibilidad; en este caso se utilizaron las AST-GN 93 que son exclusivas para bacterias Gram negativas, finalmente se realizó la programación de las tarjetas en el equipo y se obtuvieron resultados a las 18 horas.

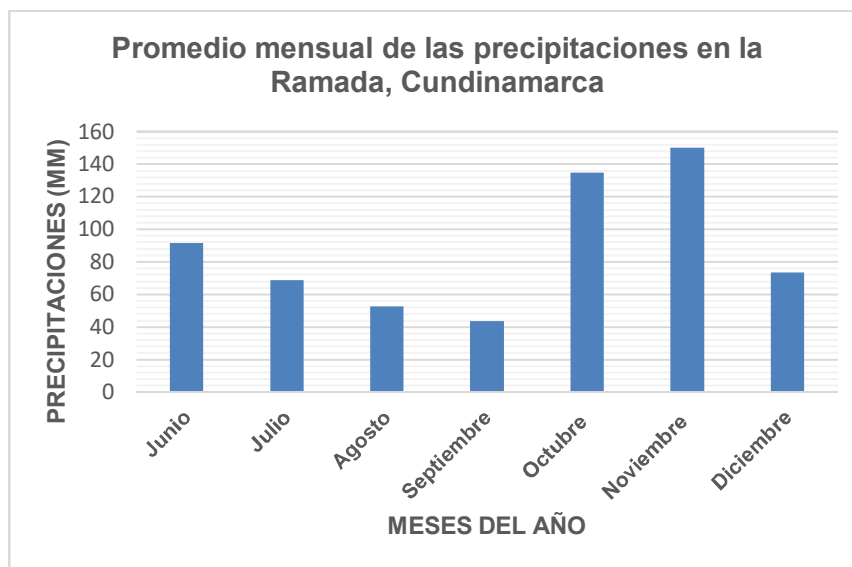
4.3 Análisis estadístico

Para el presente estudio se determinó emplear un análisis de componentes principales (ACP), el cual permitió relacionar y asociar los resultados obtenidos. Para este análisis se agruparon 16 variables tomando valores propios mayor que 1 y las cargas factoriales se consideraron significativas por encima de 0,7, lo que permitió tomar los tres primeros factores que reportan una varianza significativa excluyendo los dos últimos factores por ruido (Conti, Iacobucci, Cucina, & Mecozzi, 2007), esto se hace con el fin, de verificar similitudes y diferencias mediante el diagrama diferencial, el cual fue desarrollado por el programa Grapher versión 14. Las variables relacionadas fueron nitrógeno total (NTK), oxígeno disuelto (OD), conductividad eléctrica (CE), potencial de hidrógeno (pH), temperatura, demanda química de oxígeno (DQO), demanda bioquímica de oxígeno (DBO5), carbono orgánico total (COT), sólidos suspendidos totales (SST), sulfatos, cloruros, fosfatos, nitritos y nitratos y NMP de coliformes totales y fecales.

Este análisis se desarrolló mediante el software Statistica versión 10.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con los informes de las precipitaciones del Centro de investigación Marengo de la Universidad Nacional y la CAR de los meses comprendidos entre Junio a Diciembre del año 2001 al 2019, se pudo establecer las dos campañas de muestreo para el presente proyecto (Temporada seca y Temporada Lluvia), donde los meses de junio, octubre y noviembre correspondían a temporada lluvia, mientras que para temporada seca se tuvieron en cuenta los meses de julio, agosto y septiembre (Ver **Gráfica 5-1**) y así mismo, porque el inicio experimental del estudio se tenía proyectado para el segundo semestre del año 2019. Teniendo en cuenta esto, se tuvieron un total de 16 muestreos, los cuales fueron de vital importancia para tener una reproducibilidad en los datos.



Gráfica 5-2. Media de las precipitaciones mensuales de los años 2001 a 2019 en el Distrito de Riego la Ramada, Cundinamarca. Elaboración propia.

Por otro lado, y teniendo en cuenta los estudios previos realizados por Cubides, 2018 se puede observar cómo actividades antropogénicas y los asentamientos urbanos se han venido desarrollando cerca de los canales de riego, influyendo en la calidad del agua, ya que, informes anteriores de la CAR y los resultados obtenidos dentro de este estudio, confirman el alto contenido de contaminantes microbiológicos y químicos, dado que, las descargas de agua residual industrial y doméstica se realizan a través de los canales, siendo una problemática, debido a que aguas abajo son usadas en la irrigación de cultivos.

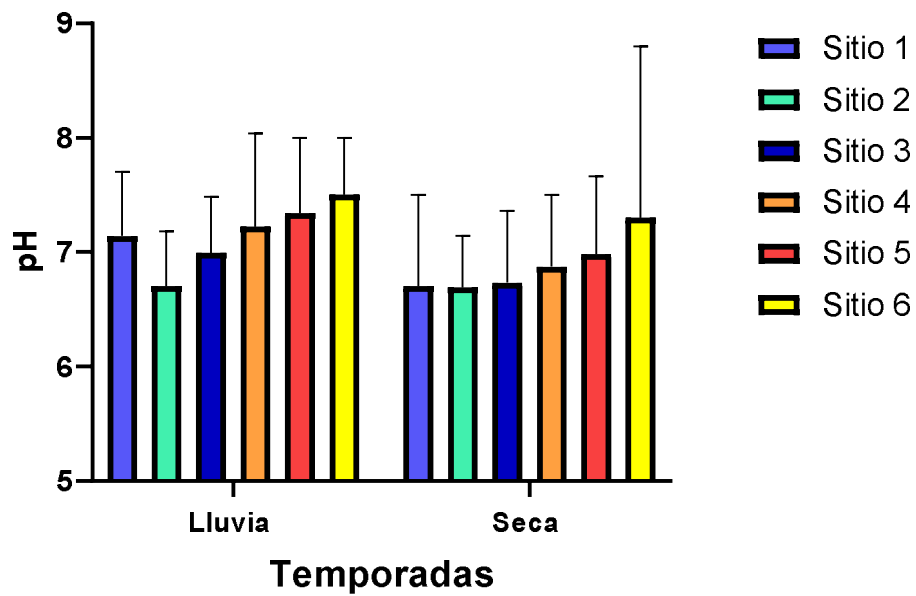
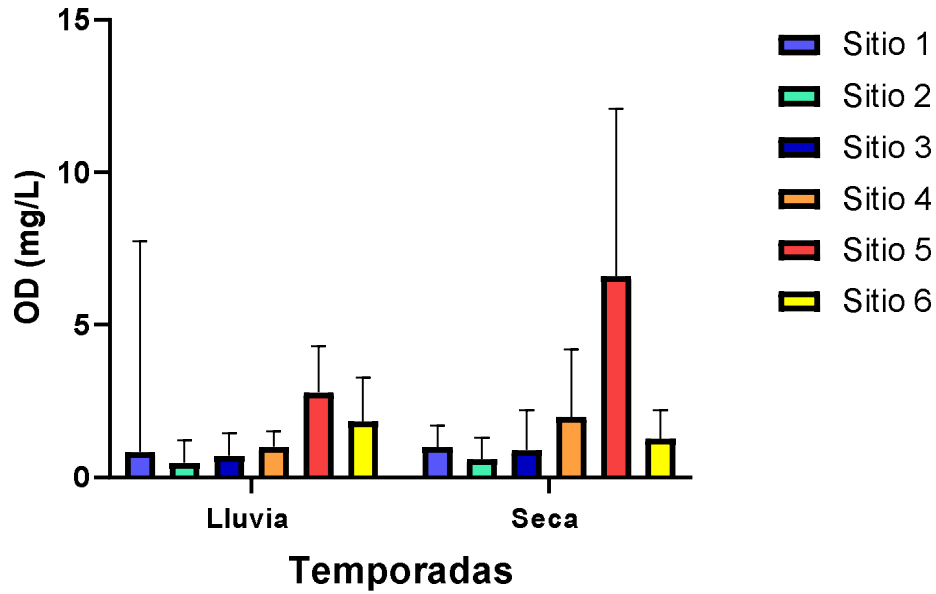
5.1 Medición de parámetros *In situ*

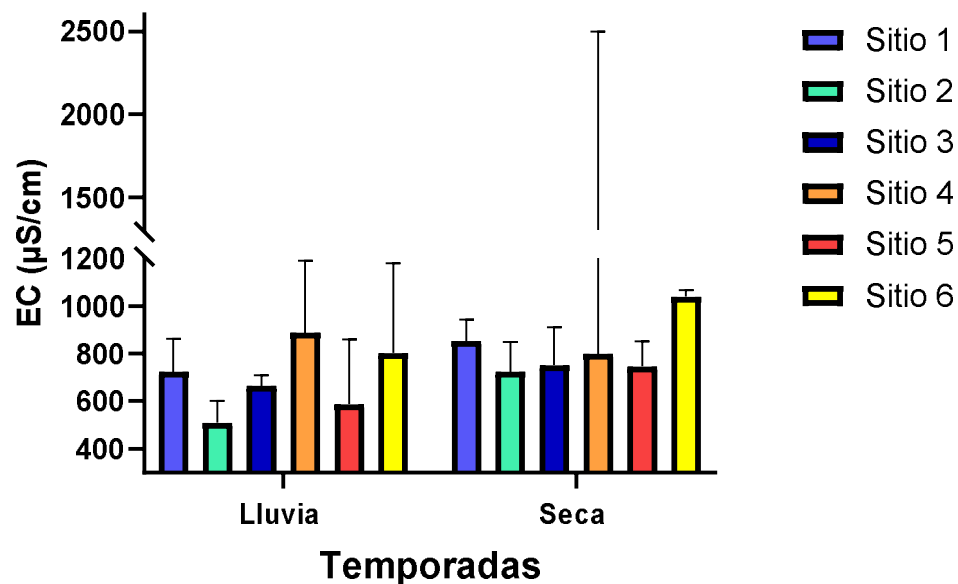
En este estudio se evaluó la calidad del agua de riego de La Ramada, y los resultados de los parámetros medidos *in situ* se muestran en la **Gráfica 5-3**. Se presentaron diferencias significativas entre sitios y temporadas climáticas, donde se puede observar cómo los valores promedio de pH en temporada seca para los sitios 1, 2 y 3 se encontraron cerca de valores neutros (pH 7), mientras que para los demás sitios en temporada lluvia, oscilaron entre valores de 6.5 y 7.5, siendo el rango más alto obtenido en esta campaña. Cabe resaltar, que estos resultados están acordes a los establecidos por el Decreto 1594 de 1984 para riego agrícola (4-5 a 9) siendo viables para su uso. Por otra parte, los valores de OD (Oxígeno disuelto) mostraron una variabilidad entre ambas temporadas, observando valores por debajo de 2 mg/L siendo similares a los reportados por Arguello y Bustos 2018 y Cubides 2018 en el área de estudio; mientras que en el sitio 5 en temporada seca se pudo obtener un valor por encima de 6 mg/L siendo el valor más alto entre ambas campañas.

Los valores de OD obtenidos son comparables con aguas que reciben descargas de aguas residuales domésticas sin tratar, debido a la alta carga de materia orgánica que se presentan en estos cuerpos de agua (Cubides, 2018; Kadlec & Wallace, 2009; Torres, 2004). Así mismo, cambios en la temperatura de estos efluentes pueden afectar el grado de saturación de este parámetro, ya que, un aumento en la temperatura provoca la disminución de la concentración de oxígeno y afectar procesos de degradación (Abella y Martínez, 2012), en los canales de riego se pudo establecer mediciones entre 15 a 18 °C.

Es importante destacar, que en época seca la disminución del flujo hídrico, puede conllevar a que igualmente el OD disminuya y la degradación de compuestos orgánicos por

microorganismos se incrementa, conllevando a condiciones anóxicas en este tipo de ambientes acuáticos (Boman, Wilson, & Ontermma, 2012).





Gráfica 5-3. Promedio de OD ($\text{mg/L}^{-1} \text{O}_2$), pH y conductividad ($\mu\text{S/cm}$) en aguas de uso agrícola del Distrito de Riego de la Ramada.

Por otra parte, la medición de la conductividad presentó variaciones significativas entre temporada, observando como en temporada seca se presentaron los valores más altos principalmente por el aumento de iones disueltos cuando el flujo hídrico disminuye y así mismo, por la posible descarga de aguas residuales que se está generando a los canales de riego (Van Vliet y Zwolsman 2008). Mientras que, el sitio 4 y el sitio 6 en ambas temporadas fueron los que obtuvieron valores por encima de 700 mg/L , y esto se debe al incremento y a la concentración de actividades antropogénicas alrededor de los canales, siendo un indicador de contaminación generada por aguas residuales. Valores altos en la conductividad pueden presentar una afectación en el desarrollo de cultivos por enfermedades en la raíz, junto con la alteración de las estructuras de los tejidos en las plantas si son irrigadas con este tipo de efluentes contaminados.

Cabe señalar que, la conductividad eléctrica no se tiene establecida dentro de la normativa de agua para uso agrícola, pero si es un buen parámetro que indica contaminación por vertimientos de aguas residuales, como lo manifiestan los estudios de Rahimi, Kalantari, Sharifidoost, & Kazemi, 2018, donde presentan valores de 750 $\mu\text{S/cm}$, como consecuencia

de un alto contenido de cargas contaminantes orgánicas e inorgánicas, comparándolos con los de este estudio donde se evidencian variaciones de los valores para este parámetro.

Por su parte, los valores obtenidos en temporada lluvia para los sitios 1,2,3 y 5, se deben al efecto dilución y a la acción de arrastre de sedimentos por procesos de escorrentía superficial por lluvia (Ospina Zuñiga, García Cobas, Gordillo Rivera, & Tovar Hernández, 2016).

5.1.1 Determinación de nitrógeno, fósforo, sulfatos y cloruros

En lo que respecta, a la determinación de nitrógeno, nitratos, nitritos, sulfatos, cloruros y fosfatos en aguas se presentan en la **Tabla 5-1** observando la variabilidad de los resultados en cada uno de los sitios. Se obtuvieron altos contenidos de Nitrógeno total en cada uno de los sitios evaluados, tanto para temporada lluvia como para temporada seca, observado valores por encima de 5 mg/L^{-1} N-NTK, siendo extremadamente contaminadas por nitrógeno, el cual puede provenir de actividades agrícolas por el uso de fertilizantes y presencia de estiércol de animales o heces humanas (FAO, 2013) o por la descarga de aguas residuales domésticas, ya que, valores por encima de 1.75 mg/L son característicos de este tipo de vertimientos.

También se pudo observar la presencia de nitratos y nitritos en todos los sitios en ambas temporadas, donde la variación de nitratos osciló entre 0.1 a 0.5 mg/L , mientras que para nitritos fue de 0.1 a 4 mg/L , siendo más altos en temporada lluvia e inclusive estando por encima de los resultados reportados por Cubides, 2018. Igualmente, este tipo de concentraciones no deben estar por encima de 0.25 mg/L y 0.05 mg/L en aguas superficiales, ya que, favorecerían no solo procesos de eutrofización, sino que pueden disminuir los niveles de oxígeno disuelto y a ocasionar en los cultivos una sobreestimulación del crecimiento.

Del mismo modo, se analizó la presencia de fósforo total en aguas de irrigación agrícola y los resultados se presentan en la **Tabla 5-1**, donde se evidencia variaciones de 0.7 a 5 mg/L en ambas temporadas, superando los niveles establecidos en aguas superficiales (0.23 mg/L), la cual puede ser atribuida al uso de compuestos agroquímicos y por posibles descargas de vertimientos urbanos e industriales cerca a los canales de riego, igualmente

se podría considerar que estas aguas están realizando procesos de eutroficación, las cuales permiten crear una atmosfera anóxica y permitiendo que el oxígeno disuelto disminuya como se pudo evidenciar en este estudio (Singh, 2016), y en particular, ayudando a la proliferación de plantas acuáticas en la superficie de estos efluentes.

Tabla 5-1. Media de parámetros físico químicos medidos en aguas de re uso agrícola del Distrito de Riego la Ramada.

Parámetros	Sitios	Rango	Promedio datos Época Lluvia	Rango	Promedio datos Época Seca
NTK (mg/L ⁻¹ N-NTK)	Sitio 1	0.3 a 13.44	10,02	2.24 a 10.08	5,63
	Sitio 2	8.4 a 17.36	12,73	2.8 a 15.12	8,34
	Sitio 3	5.2 a 13.72	9,66	3.36 a 11.76	7,84
	Sitio 4	6.16 a 23.24	14,28	0.84 a 85.68	19,28
	Sitio 5	0.84 a 38.08	8,73	0.3 a 72.8	22,68
	Sitio 6	14 a 26.76	18,71	2.8 a 59.64	31,42
Nitritos (mg/L ⁻¹ N- NO ₃)	Sitio 1	0.1	0,1	0.1	0,1
	Sitio 2	0.1 a 0.3	0,05	0.1 a 0.9	0,18
	Sitio 3	0.1 a 0.8	0,3	0.1 a 0.6	0,17
	Sitio 4	0.1 a 1.3	0,8	0.1 a 0.26	0,12
	Sitio 5	0.1 a 1.1	0,28	0.1	0,1
	Sitio 6	0.1 a 2.3	0,51	0.1 a 0.3	0,25
Nitratos (mg/L ⁻¹ N- NO ₂)	Sitio 1	0.1	0,1	0.1 a 0.75	0,2
	Sitio 2	0.1 a 3.6	0,77	0.1 a 0.57	0,28
	Sitio 3	0.1 a 3.4	0,94	0.1 a 0.60	0,24
	Sitio 4	0.1 a 12.1	4,52	0.1 a 0.54	0,14
	Sitio 5	0.1 a 5.8	1,77	0.1 a 0.38	0,15
	Sitio 6	0.1 a 5.1	1,82	0.1 a 4.2	1,19
Sulfatos (mg/L ⁻¹ SO ₄ ²⁻)	Sitio 1	0.1 a 123.9	83,55	0.1 a 323,9	202,63
	Sitio 2	0.53 a 129.3	32,13	0.1 a 270,8	96,44
	Sitio 3	2.3 a 188.6	81,47	37.1 a 256.2	144,01
	Sitio 4	70 a 222.96	105,64	16.1 a 259.8	126,49
	Sitio 5	12.6 a 107.7	43,99	0.1 a 187,51	61,3
	Sitio 6	26.5 a 116.8	75,43	47.6 a 308.76	148,09

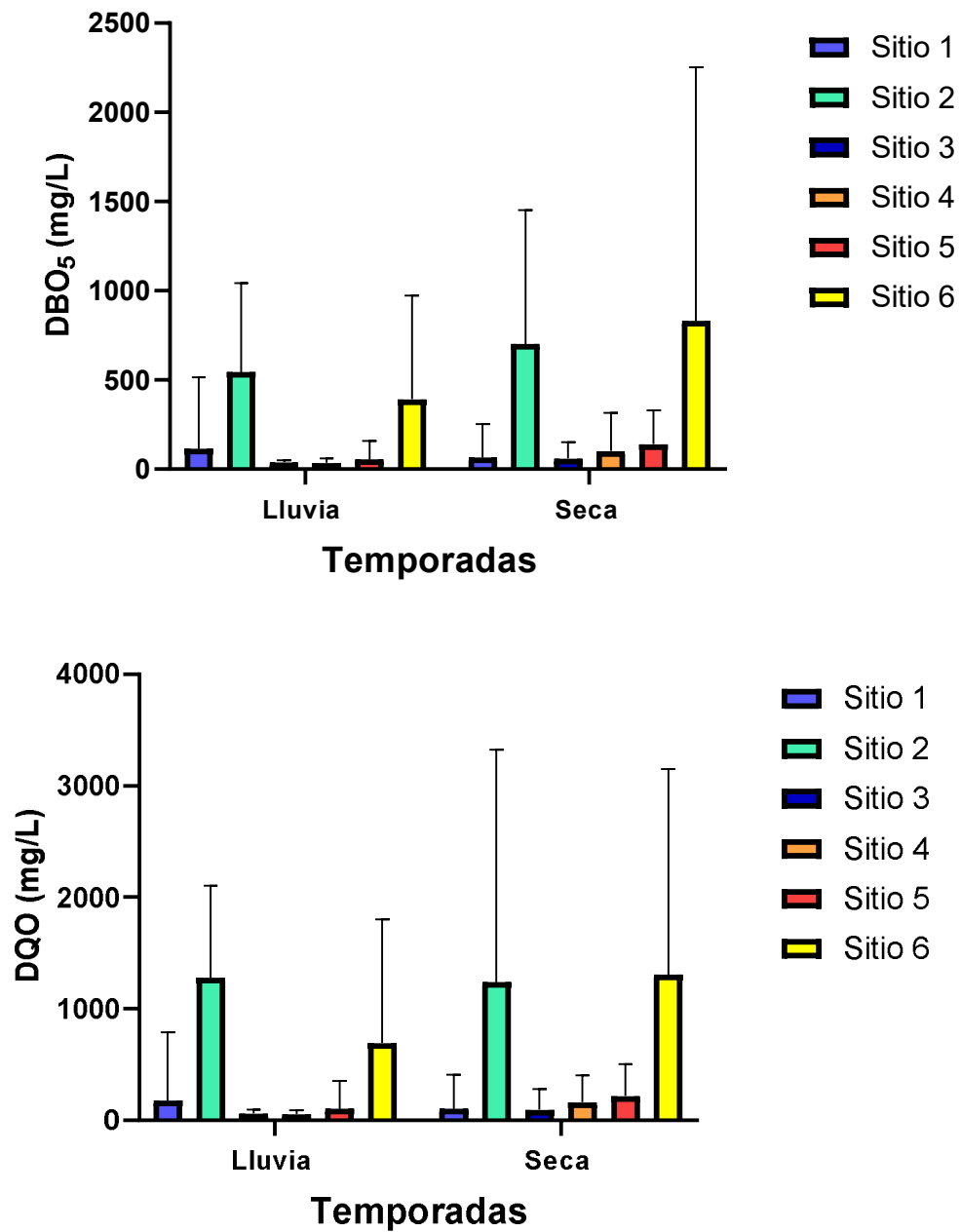
Fosfatos (mg/L⁻¹ PO₄³⁻)	Sitio 1	0.51 a 4.3	3,68	0.2 a 8.14	2,28
	Sitio 2	0.2 a 15.21	3,33	0.2 a 4.8	1,8
	Sitio 3	0.2 a 4.9	3,38	0.2 a 1.5	0,76
	Sitio 4	0.2 a 3.8	2,48	0.2 a 12.8	2,1
	Sitio 5	0.2 a 4.9	1,28	0.2 a 9.3	1,64
	Sitio 6	0.2 a 2.84	2,07	0.2 a 12.2	5,28
Cloruros (mg/L⁻¹ Cl-)	Sitio 1	0.9 a 97.3	70,18	0.1 a 114.7	67,68
	Sitio 2	0.66 a 104.2	57,14	0.1 a 111.2	55,45
	Sitio 3	26.3 a 111.8	62,08	18.6 a 79.2	53,69
	Sitio 4	0.08 a 109	66,06	17.9 a 391.7	84,76
	Sitio 5	13 a 130.7	60,72	0.1 a 105.8	45,88
	Sitio 6	25 a 55.6	44,49	46.9 a 97.2	73,95

Con relación a la medición de iones (sulfatos y cloruros), se pudo establecer valores por encima de 40 mg/L en ambas temporadas y en los diferentes sitios de muestreo, siendo concentraciones altas en comparación con las reportadas por Cubides, 2018. Visto que, la presencia de actividades antropogénicas y actividades agrícolas (como el uso de fertilizantes orgánicos y minerales) cerca a los canales de riego se ha venido incrementado, la presencia de compuestos como sulfatos y cloruros se ve considerado por vertimientos de aguas residuales domésticas e industriales sin tratar (Wasim Aktar, Paramasivam, Ganguly, Purkait, & Sengupta, 2010). Además, concentraciones mayores a >150 mg/L de sulfatos resultan ser inapropiadas para ser usadas como riego por la toxicidad que puede presentar a los cultivos y por presentar desbalances nutricionales en las plantas (Pivić, Stanojković-sebić, Maksimović, Jošić, & Dinić, 2018).

5.1.2 Determinación DQO, DBO₅ y COT

En la **Gráfica 5-4** y en la **Tabla 5-2**, se observa la media de los valores reportados en los sitios muestreados para la evaluación de parámetros como de DBO₅, DQO y COT. Se presentan los valores más altos de DBO₅ y DQO correspondientes a el sitio 2 y a el sitio 6, obteniendo valores por encima de 400 mg/L en ambas temporadas superando los valores reportados anteriormente por Argüello & Bustos, 2018 y Cubides, 2018, mientras que para los demás sitios se pudo observar rangos de 36 mg/L a 136 mg/L para DBO₅, mientras que para DQO los valores oscilaron entre 53 mg/L a 215 mg/L para ambas temporadas.

Los resultados obtenidos para DBO₅, aseguran que las aguas de los canales de riego agrícola están contaminadas por aguas residuales sin tratar, ya que, Mishra *et al.*, 2017 plantea que valores por encima de 15 mg/L en aguas superficiales, se deba a que contienen una alta concentración de material orgánico. Igualmente, valores por encima de 200 mg/L para DBO₅ son características de aguas residuales, evidenciando como estos efluentes para riego contienen similitudes por los valores establecidos en este estudio. Mientras que, para valores por encima de 400 mg/L son establecidos para áreas industriales, viendo la influencia de actividades antropogénicas en estos canales (Lazcaro, 2016).



Gráfica 5-4. Media de valores de DQO (mg/L O₂), DBO₅ (mg/L O₂) en aguas de uso agrícola del Distrito de Riego la Ramada.

Además, los resultados para DQO (**Gráfica 5-4**) donde nuevamente los sitios 2 y 6 obtuvieron los máximos valores en ambas temporadas en comparación con los demás sitios con valores por encima de 1000 mg/L. Esto refleja como aguas industriales posiblemente se están vertiendo a los canales de riego (Sitio 6) predominando material

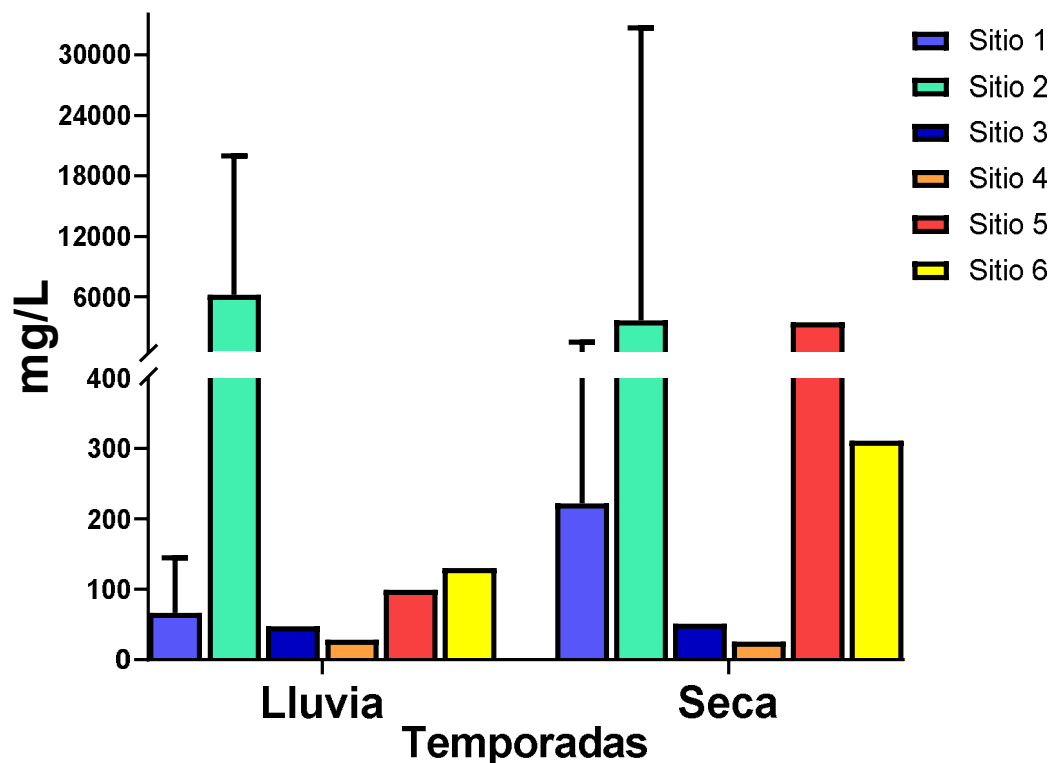
inorgánico, el cual no puede ser degradado biológicamente y quedando a su vez, en los sedimentos y resuspendido en las aguas superficiales (Boman et al., 2012). En cuanto a, el sitio 2 su incremento es debido al material vegetal presente en la superficie de estos efluentes, ya que, al degradarse el material particulado puede quedar suspendido e inmovilizado.

Tabla 5-2 Media de COT de los diferentes sitios de muestreo medidos en aguas de re uso agrícola del Distrito de Riego la Ramada.

Parámetros	Sitios	Rango	Promedio datos Época Lluvia	Rango	Promedio datos Época Seca
COT (mg/L)	Sitio 1	8.3 a 36.8	16,67	5.6 a 137	34,01
	Sitio 2	72 a 712.5	296,28	11.3 a 134.7	44,43
	Sitio 3	10.5 a 36.8	19,2	9.4 a 31.5	22,83
	Sitio 4	7.5 a 33	17,45	9 a 182.6	50,42
	Sitio 5	4.9 a 95.3	31,42	23.3 a 170.4	61,97
	Sitio 6	266.5	131,15	24.8 a 164.4	72,59

Elaboración propia.

En cuanto a los niveles reportados para COT se registraron rangos entre 16 mg/L a 296 mg/L en temporada lluvia, mientras que para temporada seca los valores oscilaron de 22 mg/L a 72 mg/L en los diferentes sitios, debido a la degradación de materia orgánica por parte de microorganismos como *Coliformes* presentes en estas aguas de riego, ya que, nutrientes como nitrógeno y fosforo (medidos en el presente estudio y mencionados en el numeral 5.1.1) funcionan como fuente principal de alimento para su desarrollo y proliferación, disminuyendo los niveles de oxígeno y agotando el oxígeno disponible para las formas superiores de vida acuática, conllevando a que parámetros como pH, temperatura y DBO₅, se vean afectados (Dou et al., 2013; Ganjegunte et al., 2018).



Gráfica 5-5. Media obtenida para determinar S.S.T mg/L en aguas de uso agrícola en el Distrito de Riego la Ramada.

Sucesivamente, también se pudo observar el comportamiento de los datos para la determinación de los Sólidos Suspendidos Totales (SST), los cuales mostraron una gran variabilidad entre sitios y entre temporada como se muestra en la **Gráfica 5-5**. Se presentaron valores mayores para el sitio 2 con valores de 6000 mg/L para temporada lluvia y 3600 mg/L en temporada seca, seguido por el sitio 5 y sitio 6 con valores entre 99 mg/L a 3500 mg/L, superando lo reportado por Cubides en el año 2018. Cabe mencionar, que los SST se pueden incrementar por la cantidad de material orgánico e inorgánico particulado que se mantiene en suspensión y que resultan ser un indicador de vertimientos de aguas residuales, así pues, contribuyendo también a la disminución de oxígeno disuelto y a un aumento de valores de DQO y DBO₅ (Bolaños *et al.*, 2015).

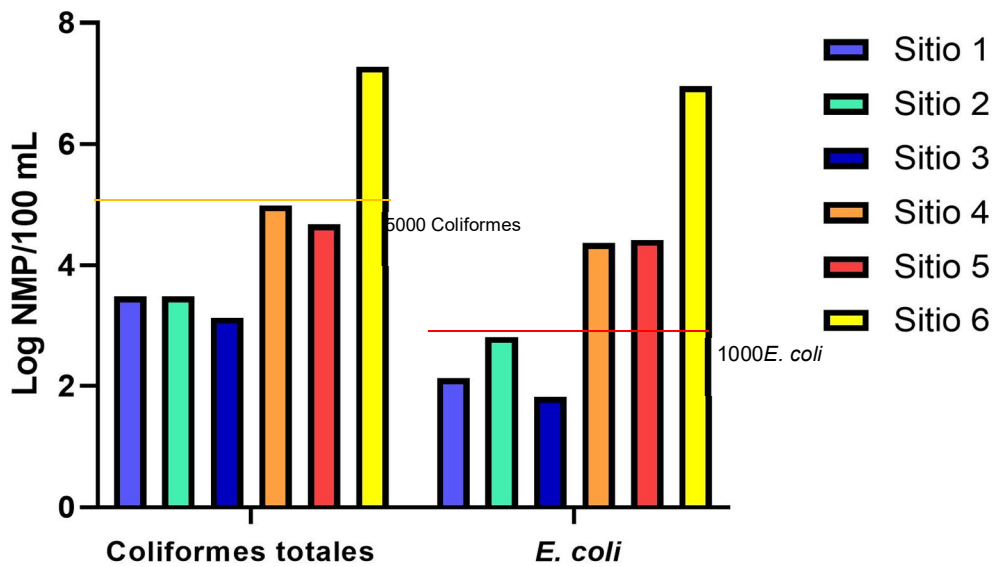
5.1.3 Determinación de *Coliformes totales* y *Escherichia coli*

Para la determinación de *Escherichia coli* y *Coliformes totales*, se tuvo en cuenta lo establecido por el decreto 1594 del 1984 mencionado anteriormente, donde se pudo

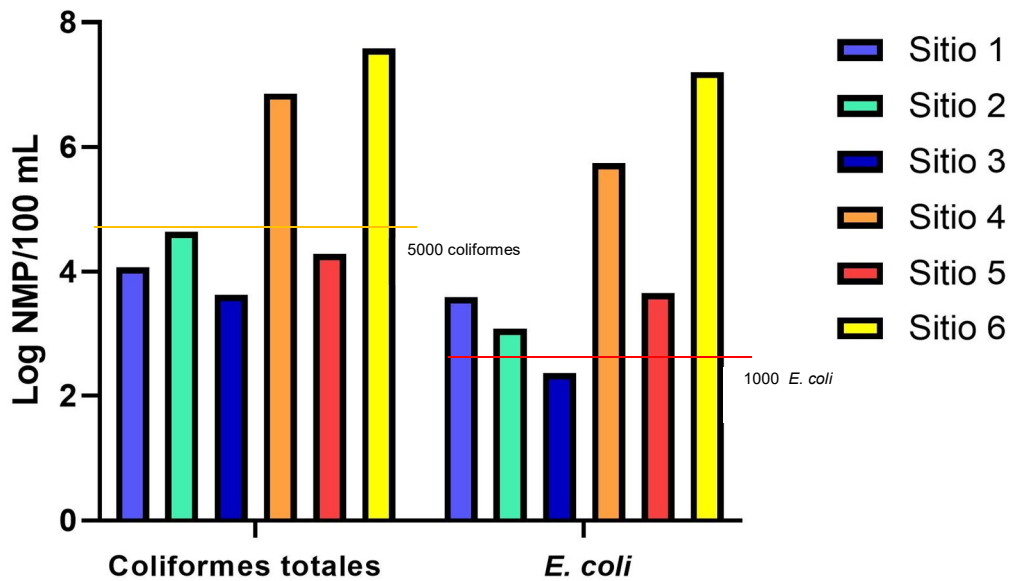
observar una variación significativa entre temporadas y entre sitios. Se presentan valores por encima de 5000 NMP/100 mL para *Coliformes totales* en el sitio 4 y en el sitio 6, mientras que para *Escherichia coli* el sitio 4, sitio 5 y sitio 6 están sobreexcedidos en temporada seca, y en temporada lluvia estos mismos sitios junto con el sitio 1 presentan una mayor concentración de estos microorganismos, siendo un riesgo de salud pública, ya que, estudios realizados por Rock *et al.*, 2019 aseguran que frutas y hortalizas irrigadas con aguas no tratadas y con altos índices de contaminación microbiana funcionan como reservorio y al ser de consumo directo, el consumidor tiene mayor riesgo de presentar enfermedades de tipo gastrointestinal.

Con relación a, los datos presentados (Ver **Gráfica 5-5**), cabe destacar que los sitios donde se observan un mayor número de microorganismos fecales, pueden provenir de actividades de urbanas y agrícolas, siendo las actividades urbanas las que presentan los valores más altos, lo que indica que asentamientos urbanos pueden favorecer la proliferación de microorganismos fecales, ya que, al no realizar un tratamiento previo antes de su uso en la agricultura, pueden ser descargados directamente a los canales por vertimientos de aguas domésticas y/o por escorrentía de desechos animales (Inyinbor *et al.*, 2019; Lees., 2016), y que al presentar altos niveles de materia orgánica pueden estimular el crecimiento bacteriano (Shankar & Kapoor, 2010), correlacionándolo con las altas concentraciones de DBO₅, DQO y nutrientes reportados en este estudio (**Gráfica 5-4** y **Tabla 5-2**).

En cambio, para el periodo de lluvia la variación de los datos en los sitios 1, 2 y 3 para la determinación de *Coliformes* y *E. coli*, se puede atribuir por la afluencia de partículas suspendidas, así como las características de la materia orgánica y cohesiva que se encuentran en los canales de agua por los sucesos de escorrentía o lloviznas durante la época de muestreo (Pachepsky *et al.*, 2016; Pandey & Soupir, 2013). Cabe resaltar, que a pesar de que no se tengan tratamientos previos para su uso, este tipo de aguas son utilizadas de una manera práctica y común para la irrigación de cultivos en Colombia.



TEMPORADA SECA



TEMPORADA LLUVIA

Gráfica 5-6. NMP/100mL de *Coliformes totales* y *E. coli* en aguas de uso agrícola del Distrito de Riego la Ramada.

No obstante, cabe mencionar que los sitios con actividad netamente agrícola, obtuvieron valores por encima de lo establecido por la normatividad colombiana, indicando que este tipo de microorganismos pueden provenir del suelo, así como de la escorrentía de las actividades avícolas, bovinas y porcinas (Mouhamad, Hussein, Alsaedi, y Nasif, 2017) que se desarrollan en la finca experimental de la Universidad Nacional.

Autores como Balkhair, 2016, afirman que el contacto directo con estas aguas no tratadas puede generar riesgo de enfermedades de origen diarreico y a nivel entérico por el consumo directo de productos agrícolas que han sido irrigados con aguas contaminadas, donde se pueden encontrar microorganismos fecales en altas concentraciones (4000 a 6000 NMP/100mL) así mismo, porque las personas que manipulan estos efluentes tienen un peligro más alto de adquirir enfermedades infecciosas.

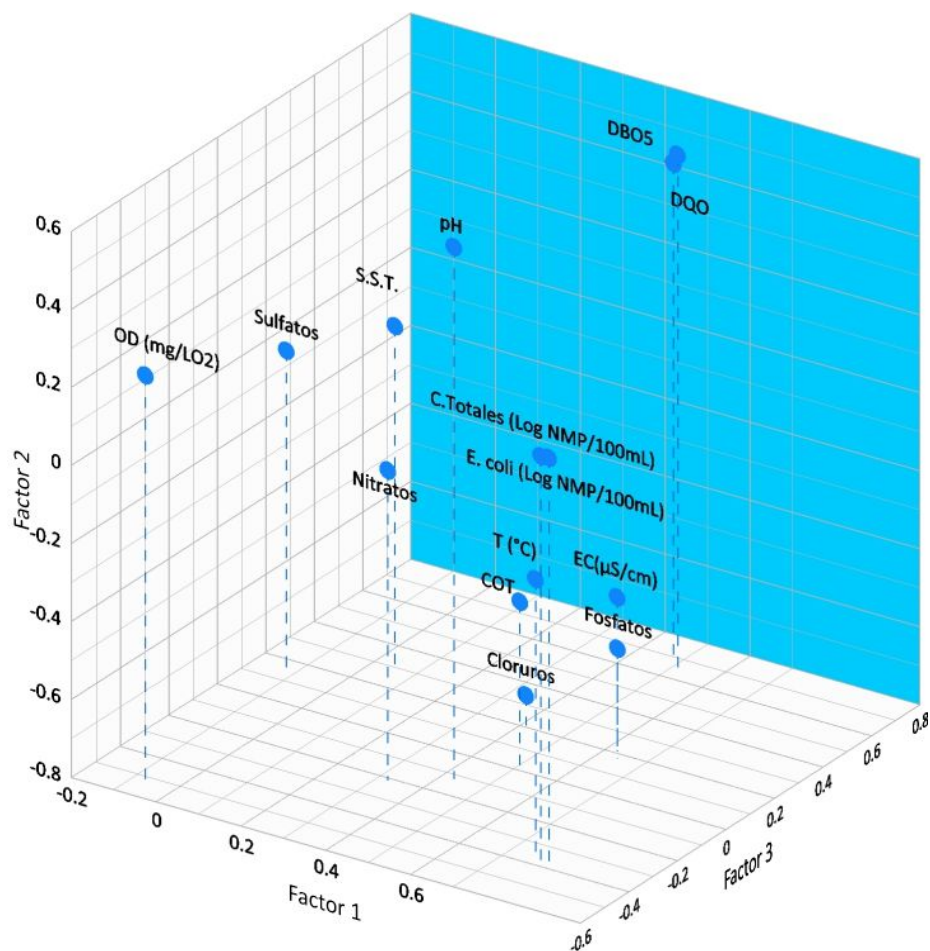
Este tipo de resultados exponen que probablemente en los canales de riego se descargan aguas residuales domésticas y agrícolas, evidenciando como desde el año 2004 hasta el presente año la situación se ha venido agravando con el tiempo según lo reportado previamente por Argüello & Bustos, 2018; Cubides, 2018 y Torres, 2004. En conclusión, estos resultados muestran que los cultivos están siendo irrigados con aguas contaminadas con material fecal.

5.1.4 Análisis de componentes principales

Para el presente estudio se determinó usar un enfoque multivariante (Análisis de componentes principales), para establecer la relación entre las variables estudiadas. Este análisis multivariado, permite investigar un conjunto de datos multidimensionales con variables cuantitativas. Así mismo, proyecta las observaciones de espacios dimensionales mediante factores, los cuales se interpretan de acuerdo con la correlación que tengan entre ellos.

Como se observa en la **Gráfica 5-6**, existe una gran variación de todos los datos evaluados, observando una correlación positiva entre DQO, DBO₅, COT, *Coliformes totales*, *Escherichia coli*, temperatura y fosfatos, ya que, al realizar el análisis de cada factor se consideró que estadísticamente si se presentan valores cercanos o iguales a $p=0.7$ son significativos; mientras que los cloruros resultaron tener una correlación negativa, es decir,

cuando aumentan las variables mencionadas anteriormente, este parámetro disminuye gradualmente.

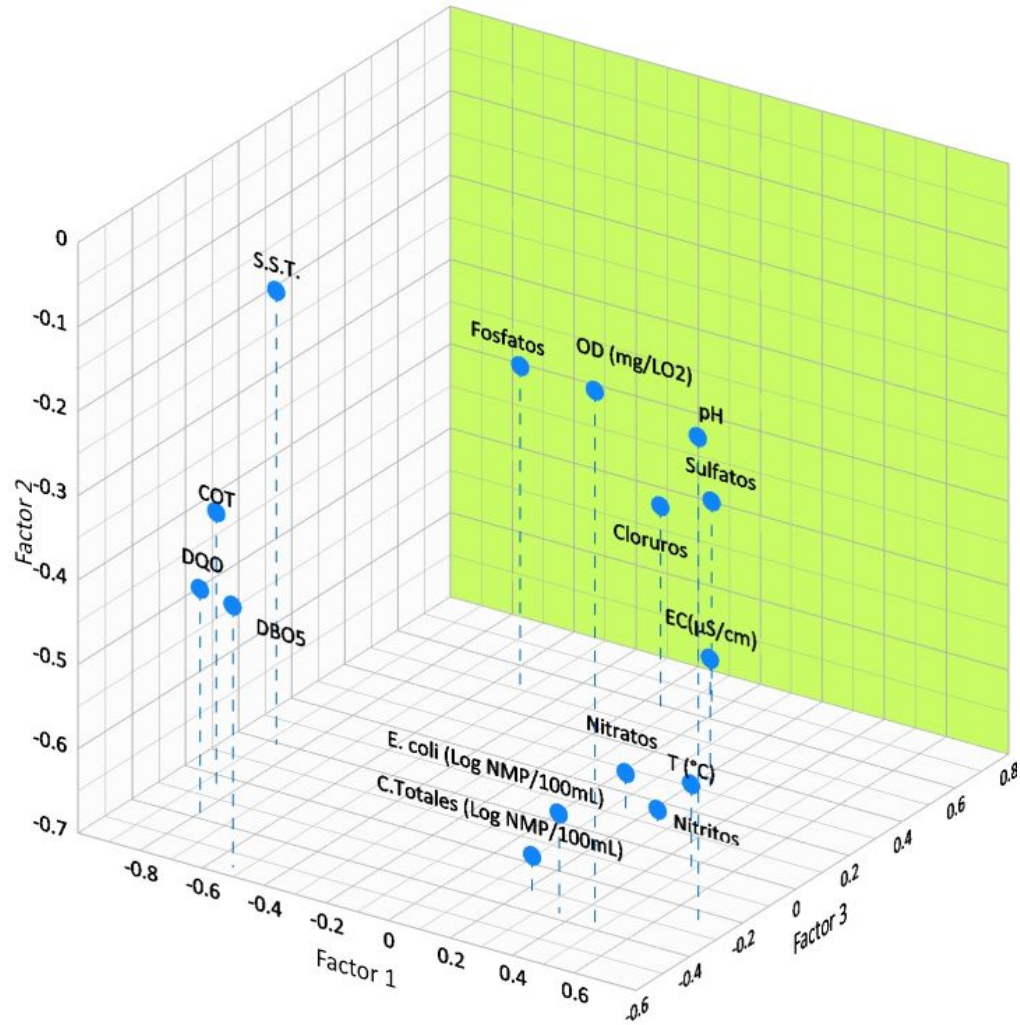


Gráfica 5-7. Análisis PCA de los datos evaluados en agua para uso agrícola en Temporada seca.

De acuerdo con esto, se puede determinar que el crecimiento y proliferación de bacterias patógenas como *Coliformes totales* y *E. coli* se da por la degradación de la materia orgánica rica en nutrientes como nitrógeno y fósforo, los cuales pueden provenir principalmente de las descargas de aguas residuales domésticas y actividades agrícolas, evidenciando rangos de 10^4 a 10^7 NMP/100 mL en este tipo de efluentes usados para irrigación en cultivos de consumo directo (Ver **Gráfica 5-8**).

Teniendo en cuenta, que este tipo de microorganismos puede desarrollarse en pH de 6 – 8 y sobrevivir a temperaturas de 4 a 45 °C (Bozaslan *et al.*, 2016), este tipo de nichos funcionan como fuente principal para su desarrollo y su procedencia está dada por contaminación fecal. Mientras, que la relación de parámetros de COT, DQO y DBO₅, está dada por los índices de material orgánico e inorgánico que presentan estos efluentes por las posibles descargas de aguas residuales, en cambio la presencia de cloruros contribuye al contenido total de sal, aumentando las concentraciones de iones y sólidos sedimentables totales en los canales de riego agrícola.

Por otro lado, en temporada lluvia se correlaciona de manera negativa variables como pH, OD, fosfatos, SST, Sulfatos, DBO₅ y DQO (Anexo 1), indicando que las actividades que se desarrollan alrededor de los canales de riego no afectan en gran medida la calidad del agua (**Gráfica 5-9**).



Gráfica 5-9. Análisis PCA en agua para uso agrícola en Temporada Lluvia.

Las variables que se estudiaron para el análisis de ACP están relacionadas entre sí, debido a que el agua residual presenta material orgánico como inorgánico, favoreciendo el crecimiento de bacterias patógenas, que al desagradar estos compuestos se observa un mayor consumo de oxígeno en ambas temporadas para los sitios 1, 2, 3, 4 y 6 (**Gráfica 5-2**). Cabe mencionar que, variables como nitritos, sulfatos, *Coliformes totales* y *E. coli* (Anexo 2) en aguas de uso agrícola favorecen procesos como la desnitrificación, y a su vez, ayudan a que estas bacterias indicadoras de contaminación fecal, puedan proliferarse y acumularse en estos efluentes por la cantidad de nutrientes orgánicos e inorgánicos que se encuentran allí.

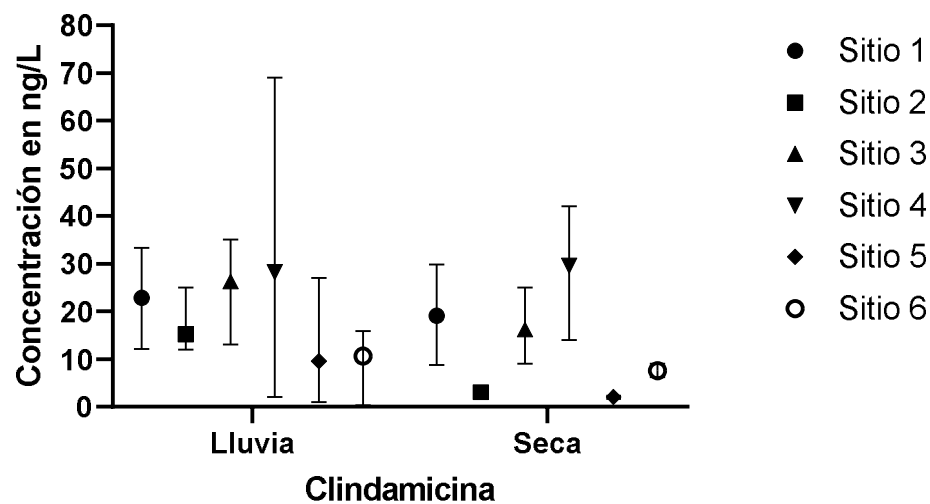
5.2 Antibióticos en aguas de uso agrícola

El área del Distrito de agua de la Ramada, Cundinamarca es suministrada principalmente por la cuenca media del Rio Bogotá y posiblemente, es alimentada por descargas directas de aguas residuales urbanas y/o urbano industriales de las actividades antrópicas que se desarrollan cercan del área de la Ramada. Desde el año 2004 se llevaron a cabo estudios por Argüello & Bustos, 2018 y Cubides, 2018 para el monitoreo de la calidad del agua para uso agrícola, donde se pudo observar la presencia de contaminantes emergentes de tipo antibióticos como clindamicina, azitromicina, trimetoprima, sulfametoxazol y ciprofloxacina en concentraciones de ng/L en aguas superficiales, especialmente en las zonas donde la presencia de población ha incrementado; siendo de vital importancia su detección por las consecuencias que genera la presencia de estos metabolitos con la flora microbiana acompañante en estos medios acuáticos.

Estudios a nivel mundial sobre la detección de antibióticos en aguas residuales, han demostrado como los ambientes acuáticos actúan como reservorio para albergar estas sustancias y como fuentes de propagación de antibióticos, ya que, la mayoría de ellos se metaboliza hasta un 40% en el organismo, pudiendo ser excretados a través de heces y orina y prevaleciendo en los ecosistemas, debido a que muchos de ellos son de baja afinidad con el agua (Log Kow), quedando inmobilizados en el suelo y en sedimentos (Bougnom & Piddock, 2017; WHO, 2014). El aumento de las concentraciones de estos compuestos en aguas para fines agrícolas sugiere que el mecanismo para su disposición final es deficiente, ya que, muchos de ellos son eliminados, a través, de efluentes sin ningún tipo de restricción y que al ser expuestos constantemente con microorganismos nativos y/o patógenos pueden ejercer presiones selectivas y favorecer el desarrollo de mecanismos de resistencia (Bielen *et al.*, 2017).

De acuerdo con esto, se decidió cuantificar compuestos antibióticos en aguas de uso agrícola, donde se pudo evidenciar la presencia de clindamicina, azitromicina, trimetoprima, sulfametoxazol y ciprofloxacina, mientras que para antibióticos betalactámicos no se pudo establecer concentraciones, debido a que no hubo detección de ellos en estos efluentes. Se obtuvieron valores promedio de clindamicina de 2 ng/L a 29 ng/L en ambas temporadas para los diferentes sitios de muestreo, siendo el sitio 4 el que presento un alto valor en comparación con las demás zonas de estudios (**Gráfica 5-8**)

y esto se deba posiblemente a que su uso se incrementa para el tratamiento de enfermedades respiratorias (temporada lluvia). Por otro lado, es un antibiótico que es utilizado ampliamente en el sector salud humano y agropecuario para el tratamiento de infecciones y que al ser excretado a través de heces hasta un 70% puede ser transportado a través del agua residual hacia los canales de riego y bioacumularse en los suelos agrícolas (Chen, Vollertsen, Nielsen, Gieraltowska Dall, & Bester, 2015).



Gráfica 5-8. Concentración en ng/L de Clindamicina en aguas de uso agrícola en los diferentes sitios de muestreo.

Cabe señalar que, tanto la legislación nacional e internacional no contemplan la cuantificación de compuestos emergentes (Antibióticos, medicamentos) en aguas superficiales, ni en aguas residuales, generando así una problemática de salud pública, debido a que no se tiene una vigilancia y control para el uso de antimicrobianos, trayendo consigo un incremento en la proliferación de microorganismos resistentes a diferentes antibióticos, ya sea, por un uso indiscriminado o por la exposición de estos metabolitos con la flora bacteriana presente en medios acuáticos (Azzam, Ezzat, Othman, & El-Dougdoug, 2017).

En comparación con los estudios realizados por Cubides, 2018 y Hernández *et al.*, 2015 en la zona de la Ramada, Cundinamarca, se pudo evidenciar la prevalencia de clindamicina en todos los sitios de muestreo (valores por encima de 5 ng/L), indicando como el desarrollo de las actividades humanas influyen alrededor de los canales de riego,

debido a que al realizar vertimientos directos de agua residual doméstica, estos compuestos pueden acumularse, ya que resultan ser de difícil degradación (Cubides, 2018). Cabe resaltar que, estas investigaciones han sido útiles para conocer inicialmente la situación actual de los contaminantes farmacéuticos en los canales, porque se ha evidenciado su presencia continua en aguas agrícolas, ya que, como se mencionó anteriormente con los estudios previos realizados en esta zona los datos reportados se encuentran por encima de 5 ng/L observando que no existe ninguna disminución de estos en aguas superficiales.

Por otro lado, se encontró la presencia de azitromicina (Ver **Tabla 5-3**) en cantidades promedio de 1.7 ng/L a 1156 ng/L en temporada lluvia, mientras que en temporada seca se observaron valores promedio de 0.8 ng/L a 39.2 ng/L posiblemente a que este antibiótico contiene un Log Kow de 4.02 haciéndolo más estable y de difícil degradación en el medio ambiente. Igualmente, se hizo la comparación con los resultados de Alygizakis *et al.*, 2020 donde se encontraron concentraciones máximas de 262 ng/L en aguas residuales tratadas para uso en el agricultura ocasionando problemas no deseados en la salud humana y animal por su consumo y desencadenando efectos como la generación de mecanismos de resistencia a diferentes antimicrobianos. Con relación a los datos obtenidos, es importante mencionar que las concentraciones observadas tanto en temporada lluvia como en temporada seca posiblemente se deban a que existe un alto índice de prescripciones de este antibiótico para tratar infecciones bacterianas de tipo humano como de tipo animal (Panthi *et al.*, 2019).

Tabla 5-3. Rango de concentraciones (ng/L) de antibióticos presentes en los diferentes sitios de muestreo.

Antibióticos	Temporada lluvia			Temporada seca			
	Sitios	Media	Mínimo	Máximo	Media	Mínimo	Máximo
Azitromicina	Sitio 1	5,4	1,2	16,1	0,8	0,1	2,3
	Sitio 2	3,1	0,1	12,3		0	
	Sitio 3	2,7	0,8	5,3	4,1	0,2	10,3
	Sitio 4	1156,3	3,1	5549,4	39,2	6,8	78,9
	Sitio 5	1,7	0,1	2,5	1,5	1,5	1,5
	Sitio 6	2,1	1,6	2,5	13,2	2,9	23,6

Antibióticos	Temporada lluvia			Temporada seca			
	Sitios	Media	Mínimo	Máximo	Media	Mínimo	Máximo
Trimetoprima	Sitio 1	180,2	16,9	395,8	194,7	37,3	280,1
	Sitio 2	232,7	21,8	783,3	171,3	88,1	247,2
	Sitio 3	158,7	14,3	340,3	230,3	124	347,7
	Sitio 4	141,7	3,5	314,7	209	29,5	304,6
	Sitio 5	202,4	17,7	445,5	238,2	8,4	583,2
	Sitio 6	452,3	34,7	1642,4	485,2	81,9	1905,6

Antibióticos	Temporada lluvia			Temporada seca			
	Sitios	Media	Mínimo	Máximo	Media	Mínimo	Máximo
Sulfametoxazol	Sitio 1	0,5	0,2	1,1	0,4	0,02	1,09
	Sitio 2	0,4	0,9	1,6	0,3	0,05	3,5
	Sitio 3	0,7	0,1	4,4	0,6	0,2	1,2
	Sitio 4	2,1	0,1	6,8	2,1	0,4	6,8
	Sitio 5	4,8	0,1	40	4,5	0,1	4,4
	Sitio 6	11,5	2	35,5	99,1	2,9	518,9

Elaboración propia.

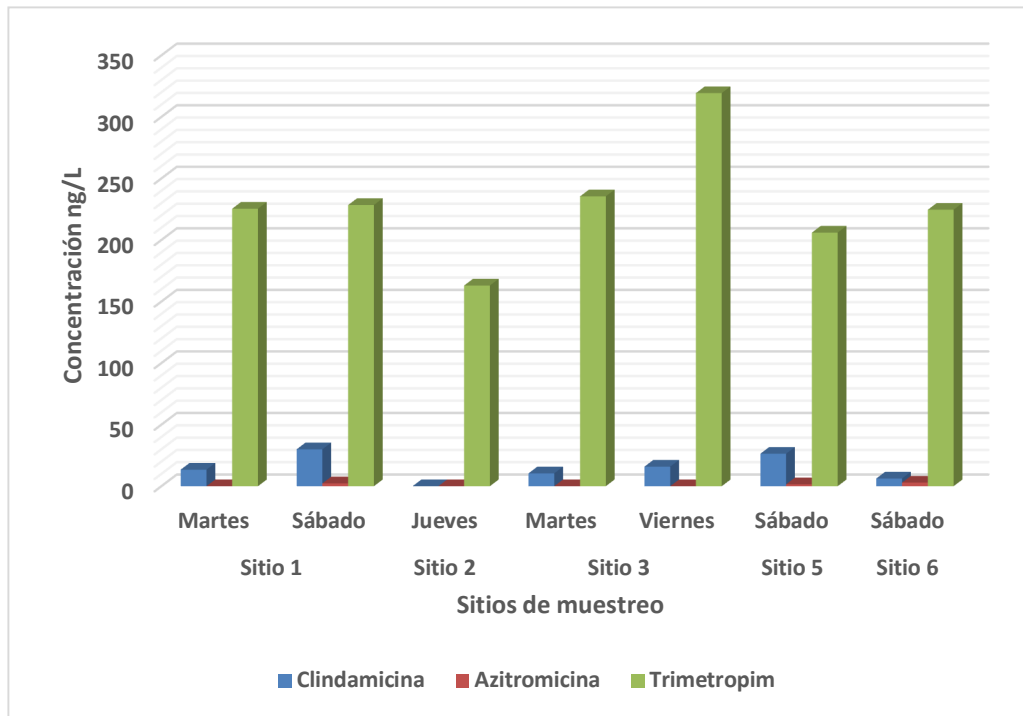
Por la preocupación que se tiene por el reporte de residuos de antibióticos en aguas, este antimicrobiano es uno de los que actualmente está siendo monitoreado por la comisión de la Unión Europea (EU COM 2015/495), la cual establece valores 19 ng/L de PNEC (que está definida como concentraciones previstas sin ningún efecto) en aguas superficiales y si se excede puede generar una alta toxicidad (Umwelt Bundesamt, 2020), correlacionándolo con los resultados de la **Tabla 5-3** en donde el sitio 4 sobrepasa este valor tanto en época lluvia como en época seca, debido principalmente a que es uno de los antibióticos más prescritos y que se encuentra comúnmente en aguas residuales tratadas y sin tratar provenientes de efluentes domésticos y de hospitales (Kulkarni *et al.*, 2017). Cabe resaltar que, el canal donde se realizó el muestreo está cerca de zonas residenciales y colegios, observando como las descargas de aguas residuales se realizan directamente a los canales de riego.

Además, se pudo observar la presencia de trimetoprima en los 6 sitios de muestreo, obteniendo valores promedio de 141 ng/L a 452 ng/L en temporada lluvia y temporada seca valores promedio de 171 ng/L a 480 ng/L, mientras que para sulfametoxazol el sitio que presento un valor más alto en comparación con los demás fue el sitio 6 con un resultado de 99 ng/L en temporada seca y 11,5 ng/L en temporada lluvia (Error! Reference source not found.3), y esto se deba por el incremento urbano en este sector y por las

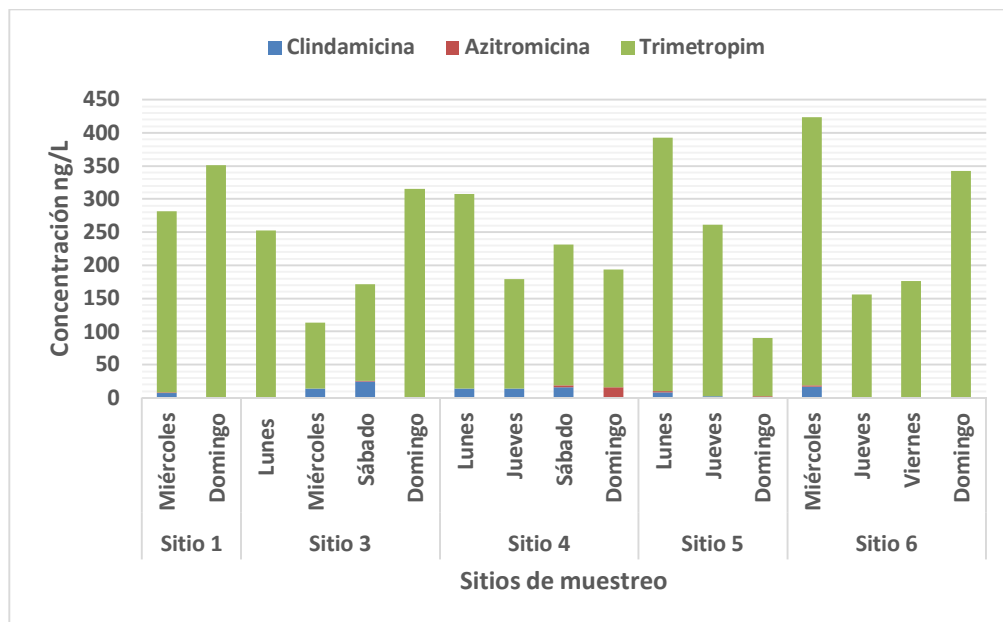
actividades que se desarrollan cerca al canal agrícola, ya que, si no se cuenta con sistemas de alcantarillado y de vertimientos, estos desechos generados pueden ser descargadas directamente a estos efluentes. Al realizar la comparación con los valores establecidos por la Unión Europea, el cual establece un valor de 600 ng/L (Draft of annual average and PNEC of active pharmaceutical ingredients; as at May 2020), y con los obtenidos dentro de este estudio, los sitios de muestreo no logran pasar estos estándares trayendo consigo problemáticas de salud pública y posiblemente un incremento de bacterias resistentes a los antimicrobianos. De acuerdo con esto, estudios Araújo *et al.*, 2017 han descrito que el agua de irrigación es la mayor fuente de contaminación en productos agrícolas, debido a que, estas bacterias al ser de origen entérico pueden colonizar el intestino y al ser expulsados a través de la heces pueden llegar a las aguas residuales que al mezclarse con aguas superficiales sin ningún tipo de tratamiento pueden ayudar a la diseminación de genes de resistencia por elementos móviles como plásmidos. Las concentraciones de sulfametoxazol obtenidas en el sitio 6 fueron más altas según lo reportado por Cubides, 2018 en la misma área estudio, ya que, se reportó un valor de 28 ng/L. Trabajos realizados por Baquero, Martínez, & Cantón, 2008 aseguran que la presencia de trimetoprima y de sulfonamidas en aguas superficiales se deba a un uso constante por parte de la población así como en granjas porcinas y avícolas, ya que, estos compuestos al tener un bajo Log Kow (<1) no es común que se encuentren en aguas superficiales.

Al realizar una correlación de la presencia de antibióticos en los diferentes sitios de muestreo, se evidencia como el sitio 3 en temporada lluvia resulta ser el día en donde más se cuantificó (ng/L) trimetoprima, seguido del sitio 1 donde se reportó concentraciones de 230 ng/L (**Gráfica 5-9**), en contraste con la temporada seca, donde el sitio 6 mostró valores por encima de 400 ng/L, de acuerdo con estos resultados se puede deducir una posible resistencia para este fármaco, que aunque no fue objeto de este estudio la relación que se presenta con este antibiótico es alta, ya que, en las bacterias recuperadas como *E. coli* lograron presentar una resistencia a trimetoprima del 63.7%, seguido de un 50% para *Citrobacter freundii* y *Klebsiella spp* (**Tabla 5-4**); ello puede obedecer a varias situaciones: 1. A una disposición de fármacos no utilizados adecuadamente (incineración, hogares, eliminación por desagües); 2. Disposición final (efluentes de hospitales); 3. Excreción animal o humana; promoviendo la generación de microorganismos resistentes y

alteraciones en la actividad enzimática del microbiota, lo cual afecta los procesos de biodegradación y ecosistemas acuáticos (Guo *et al.*, 2015).



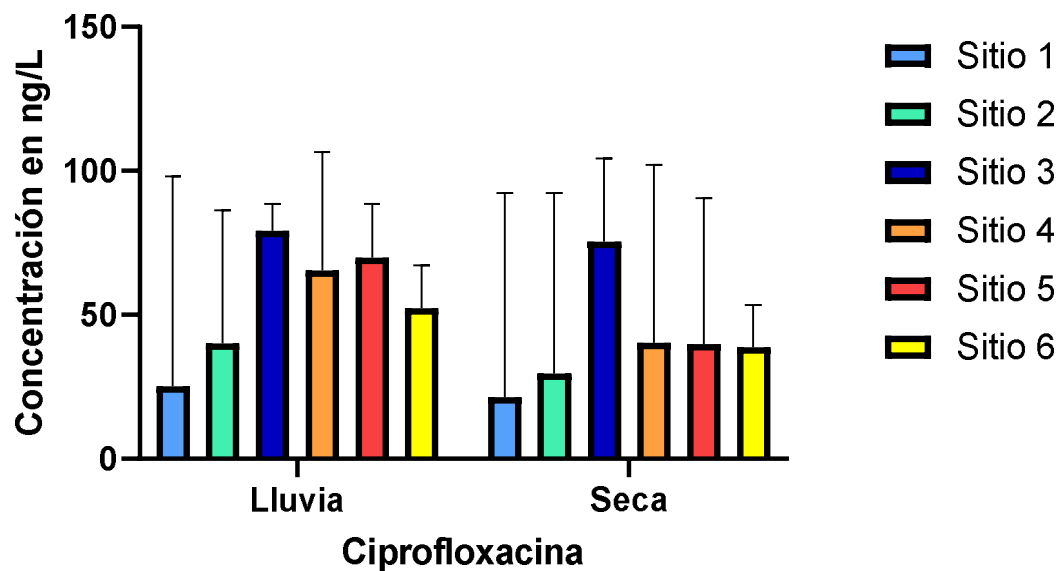
Gráfica 5-9. Correlación de presencia de antibióticos en diferentes sitios de muestreo en Temporada Lluvia



Gráfica 5-10. Correlación de presencia de antibióticos en diferentes sitios de muestreo en Temporada Lluvia.

De acuerdo a esto, y según lo reportado por la literatura para la década de los 70 y principios de los 80 TMP/SMX fue empleado para tratar bacterias Gram negativas y Gram positivas causantes de infecciones de vías urinarias, gastrointestinales, y respiratorias. Ello mostraba que históricamente *E. coli*, *Klebsiella* spp; y *Enterobacter* spp, eran muy susceptibles a este antibiótico y las infecciones urinarias sin complicaciones eran fáciles de tratar (Olson, Harrell, & Kaye, 2009). Sin embargo, el tratamiento por parte de estos antibióticos se redujo considerablemente, debido al aumento de la resistencia bacteriana producto de los diferentes mecanismos que emplean las bacterias para no verse afectadas por el uso de antimicrobianos.

Por su parte, la resistencia para las sulfonamidas empezó a evidenciarse en bacterias como *Escherichia coli* la cual mostraba porcentajes altos en comparación con otras bacterias; reportando un 29.6% en el año 2005- 2007 en USA y un 34% en el año 2016 (Mulder, Verbon, Lous, Goessens, & Stricker, 2019), y para Colombia un reporte de resistencia del 42,7% en consulta externa en muestras de orina en el año 2016 (GREBO, 2017), así mismo, presencia de resistencia en *Klebsiella* spp y *Enterobacter* spp. Además, se pudo observar variaciones significativas de los promedios de ciprofloxacina en ambas temporadas, donde el sitio 3 presentó el resultado más alto (79.2 ng/L en temporada lluvia y 75.3 ng/L en temporada seca) en comparación con los demás sitios de muestreo (**Gráfica 5-10**). Estudios realizados por Posada-Perlaza *et al.*, 2019 manifestaron que en el río Bogotá, se encontró este tipo de compuestos y en concentraciones por encima de 5 µg/L, confirmando con estos resultados su presencia y demostrando como las actividades antropogénicas están alterando las diversidades microbianas con contaminantes emergentes de este tipo y ayudando a la dispersión de posibles genes de resistencia en el ambiente. Del mismo modo, se hizo la relación con los valores establecidos con la UE (2018/840) donde se contempla un valor de 89 ng/L PNEC, donde todos los sitios se encuentran por debajo de valor, pero que posiblemente a las descargas de aguas residuales de sectores industriales, aguas residuales agrícolas y aguas residuales domésticas se pueden evidenciar rangos por encima de 20 ng/L (CAR, 2009). Cabe señalar que, este tipo de antibiótico posee una fuerte atracción por la materia orgánica y baja movilidad, lo que puede explicar su alta acumulación en los sedimentos y en el agua.



Gráfica 5-10. Concentración de ng/L de ciprofloxacina en los diferentes sitios de muestreo en ambas temporadas.

El uso indiscriminado de este tipo de antibióticos en los diferentes sectores para el tratamiento de enfermedades infecciosas, ha incrementado la resistencia por parte de bacterias como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., y *Escherichia coli*, debido a que en los procesos productivos como cría de ganado vacuno, porcino y avícola emplean quinolonas, ya sea, para tratar infecciones o como factores de crecimiento, lo cual puede contribuir a la diseminación de genes de resistencia intra o entre especies, mientras que suelos tratados con estiércol o suelos utilizados para la ganadería pueden aportar antibióticos a estos efluentes mediante procesos como escorrentía (Schulz *et al.*, 2019).

Finalmente, se destaca en este trabajo un porcentaje de resistencia a ciprofloxacina para *E. coli* (28.1%) y para *Enterobacter cloacae* (9.1%) posiblemente por el uso indebido de este antibiótico, ya que, a nivel veterinario no tiene ninguna restricción (Cataño, 2020).

5.3 Aislamiento, selección de posible resistencia a betalactámicos e identificación bacteriana

De acuerdo a metodología mencionada en el ítem 4.2.3., se aislaron un total de 768 cepas mediante la técnica de filtración por membrana, las cuales se les realizó una coloración de Gram para verificar que fueran bacilos Gram negativos y se realizó un pase a medios de cultivo selectivos para su respectiva purificación, de acuerdo con esto se llevaron a sembrar en agares cromogénicos (Agar CARBA CHROMID®, Biomérieux y Agar ESBL CHROMID®, Biomérieux) donde se lograron recuperar 116 bacterias, que se seleccionaron de acuerdo a su crecimiento masivo y a su coloración; posteriormente se les realizó su identificación mediante MALDI TOF, y se recuperaron 52 cepas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (de acuerdo a los parámetros de selección establecidos al principio del proyecto). De acuerdo con esto, se pudieron identificar bacterias como *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella* spp., y *Serratia fonticola* tanto en temporada lluvia como temporada seca en los diferentes sitios de muestreo (Tabla 5-4).

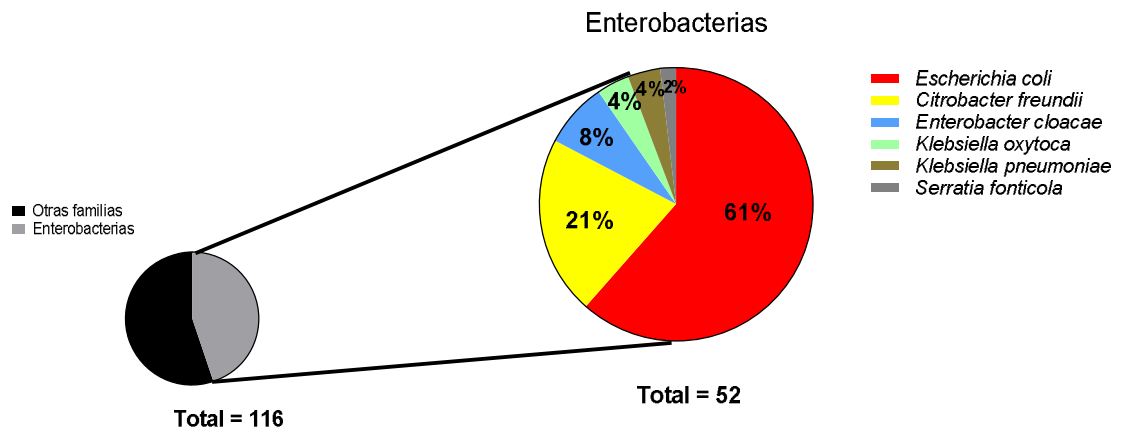
Tabla 5-4. Aislamiento de bacterias con posible resistencia a betalactámicos en temporada lluvia y temporada seca de los diferentes sitios de muestreo.

Sitios	Temporada Lluvia	Temporada Seca
Sitio 1	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Citrobacter freundii</i> y <i>Enterobacter cloacae</i>
Sitio 2	<i>Citrobacter freundii</i>	No hubo aislamiento
Sitio 3	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Serratia fonticola</i>
Sitio 4	No hubo aislamiento	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> y <i>Citrobacter freundii</i>
Sitio 5	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> y <i>Citrobacter freundii</i>
Sitio 6	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> y <i>Citrobacter freundii</i>

El porcentaje de recuperación de estas Enterobacterias (**Gráfica 5-11**), se debe principalmente, a que el agua está expuesta a excretas o a material orgánico que contiene bacterias patógenas provenientes de actividad antropogénica considerándose como reservorios y un vehículo para su diseminación (Dickin *et al.*, 2016). Su prevalencia y

resistencia, se debe a diversos factores ambientales como pH, temperatura, niveles de sodio, nitrógeno y fósforo (Schwartz *et al.*, 2003) que ayudan no solo a su propagación, sino a su sobrevivencia, ocasionando enfermedades gastrointestinales por su consumo directo, ya sea, en los alimentos frescos que no requieren cocción o por la manipulación para irrigar cultivos (Cui & Liang, 2019).

Por otro lado, se pudo evidenciar que no solo en estas aguas abundan bacterias patógenas, sino microorganismos pertenecientes al filo Proteobacteria, *Actinobacteria*, *Firmicutes* y otras clases como *Bacillos*, *Clostridios*, *Bacteroides*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* (Narciso-da-Rocha & Manaia, 2017; Narciso-da-Rocha *et al.*, 2018), las cuales pueden predominar en épocas de lluvia, debido a la escorrentía, transportando consigo, nutrientes, materia orgánica y residuos sedimentables, llegan a los canales; de igual forma, en sitios donde el impacto humano es menor, se verá la proliferación de bacterias autóctonas (Bougnom *et al.*, 2019).



Gráfica 5-11. Porcentaje de recuperación de Enterobacterias de interés clínico en aguas de uso agrícola del Distrito de Riego la Ramada.

Por otro lado, la combinación de aguas contaminadas con aguas superficiales sin ningún tipo de tratamiento, aumenta la carga de microorganismos patógenos, considerando que la mayoría de estos, proviene del intestino siendo un factor de riesgo por la probabilidad de adquirir algún tipo de enfermedad, igualmente, el uso de abonos orgánicos mezclados

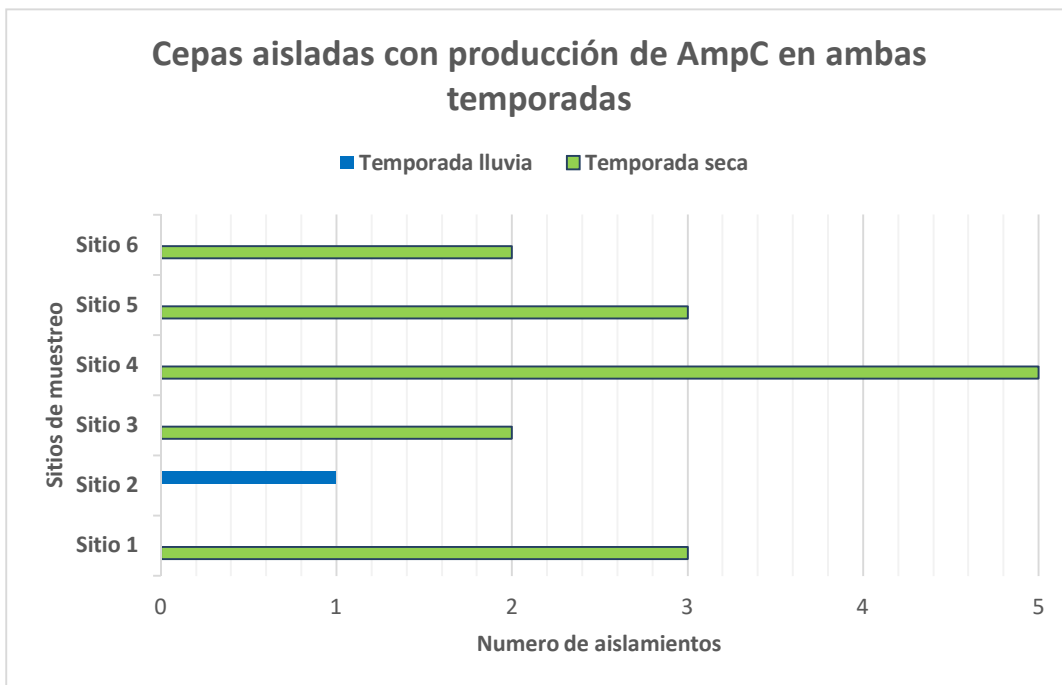
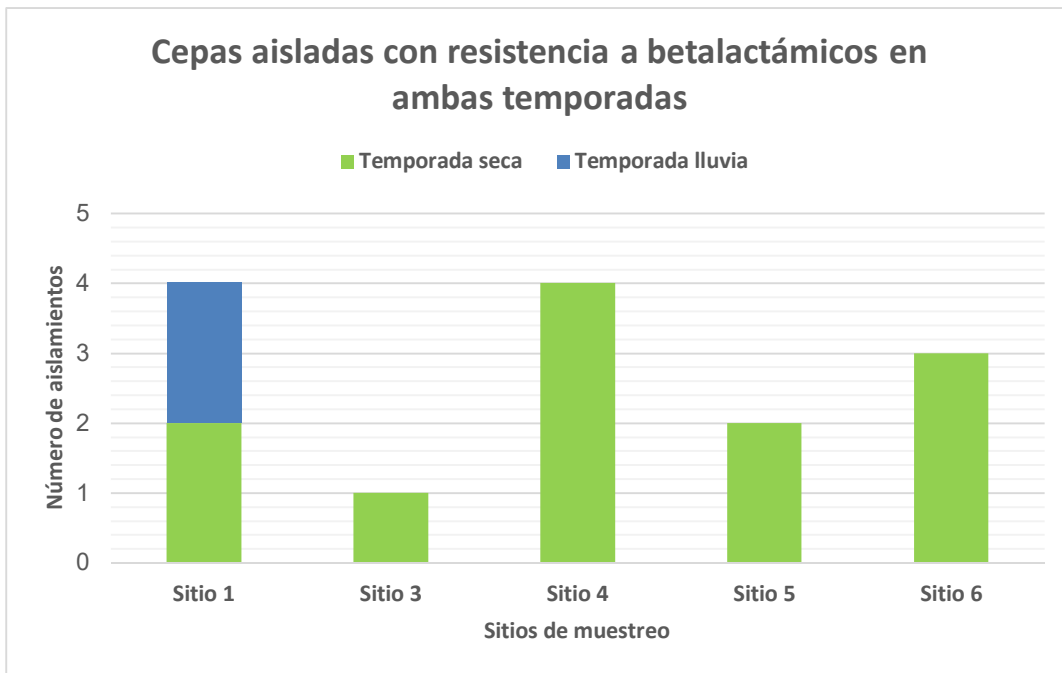
con estiércol o el uso de suelo irrigado con aguas residuales, aumenta la posibilidad de aislar bacterias como *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., las cuales, pueden perdurar en el ambiente durante mucho tiempo (Park *et al.*, 2012). Por último, al realizar la comparación con los estudios de Jablasone, Brovko, & Griffiths, 2004 y Solomon *et al.*, 2014 y los aislamientos en ambas temporadas, se puede relacionar que la presencia de patógenos en estas aguas, principalmente se debe a que los caudales, cultivos hidropónicos, inundaciones, suelos pueden transferir microorganismos de un lado a otro, siendo capaces de sobrevivir en condiciones adversas.

5.3.1 Determinación del perfil de susceptibilidad

Con el fin de observar el perfil fenotípico de las bacterias aisladas de estos efluentes se empleó el sistema VITEK® 2 Compact para la sensibilidad antimicrobiana de los aislamientos bacterianos provenientes de todos los sitios. Los aislamientos de *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* y *Klebsiella* spp., solo fueron incluidos para el estudio de susceptibilidad, debido a que hubo un mayor porcentaje de recuperación en comparación con las bacterias *Enterobacter cloacae* y *Serratia fonticola*.

Se lograron aislar un total de 14 cepas con resistencia a betalactámicos en temporada lluvia y temporada seca (**Tabla 5-4**) siendo el sitio 4 y sitio 6 donde se obtuvo un mayor número de bacterias con resistencia a betalactámicos y posiblemente se deba a que en estas zonas se concentra una mayor actividad antropogénica e industrial en comparación con los sitios netamente agrícolas (Caltagirone *et al.*, 2017). Por otro lado, se logró aislar cepas resistentes a betalactámicos en el sitio 1 en ambas temporadas, mientras que en el sitio 3, sitio 4, sitio 5 y sitio 6 solo se obtuvieron bacterias en temporada seca, exceptuado el sitio 2 donde no hubo alguna recuperación microbiana. Según estudios realizados por MacFadden *et al.*, 2018 afirma que el cambio climático aumenta la proliferación de bacterias resistentes a antimicrobianos principalmente en verano, debido a que al no tener un movimiento hídrico, los antibióticos que llegan a los canales se quedan inmovilizados y tardan en degradarse, ejerciendo presiones selectivas entre las moléculas y los microorganismos presentes allí facilitando la transmisión horizontal de genes y ayudando a el crecimiento de cepas en fuentes de agua y alimentos.

Cabe señalar que, bacterias como *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* y *Serratia fonticola* son productoras de AmpC (**Tabla 5-4**) las cuales al realizar el análisis VITEK, se pudo ratificar su producción, donde se recomienda evitar el uso de cefalosporinas de tercera generación y de aztreonam.



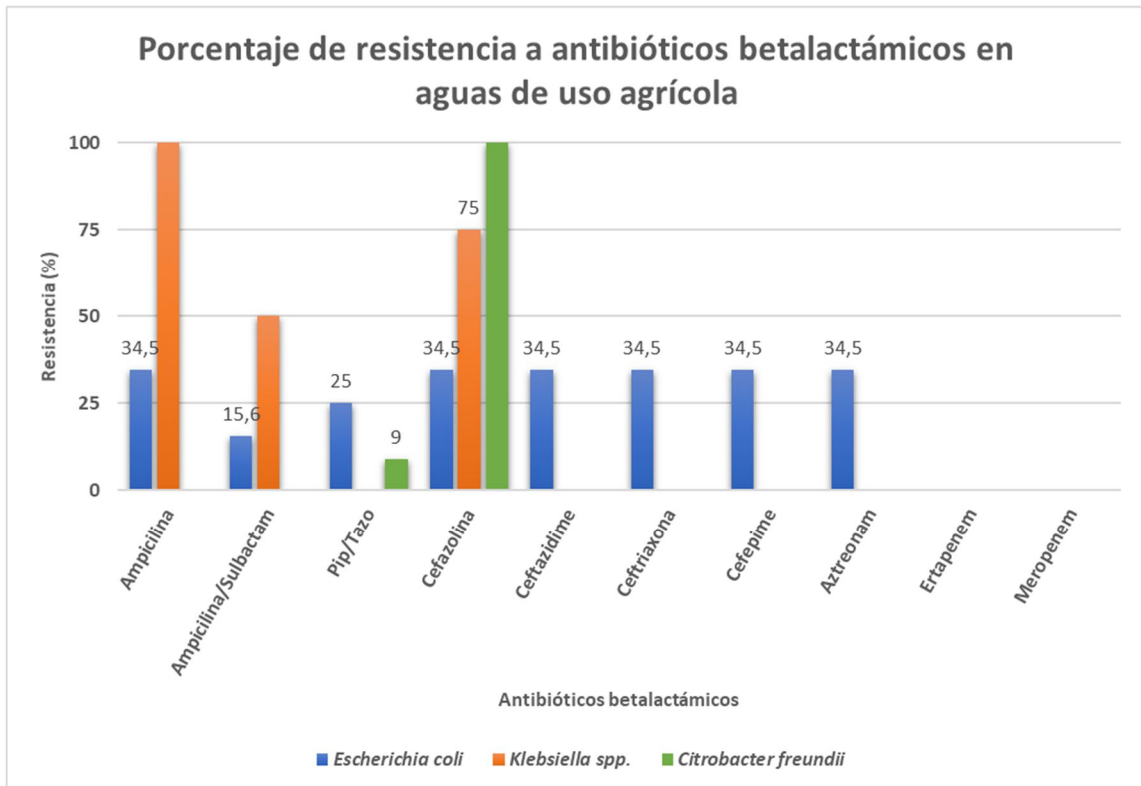
Gráfica 5-12. Comparación de bacterias aisladas de efluentes agrícolas con resistencia a antibióticos betalactámicos y cepas con producción de AmpC en Temporada seca y Temporada lluvia.

Tabla 5-5. Perfil de susceptibilidad de bacterias como *E. coli*, *Citrobacter freundii* y *Klebsiella spp.*, aisladas en muestras de agua mediante análisis VITEK

Antibióticos	<i>Escherichia coli</i> n: 32			<i>Citrobacter freundii</i> n: 11			<i>Klebsiella spp.</i> n: 4		
	Sensible (%)	Intermedio (%)	Resistente (%)	Sensible (%)	Intermedio (%)	Resistente (%)	Sensible (%)	Intermedio (%)	Resistente (%)
Ampicilina	65.7 (21)	0	34.3 (11)	--	--	--	0	0	100 (4)
Ampicilina/Sulbactam	12.5 (25)	6.25 (2)	15.6 (5)	--	--	--	25 (1)	25 (1)	50 (2)
Piperacilina/Tazobactam	68.7 (12)	6.25 (2)	25 (8)	55.7 (6)	36.3 (4)	9 (1)	25 (1)	75 (3)	0
Cefazolina	65.7 (21)	0	34.3 (11)	0	0	100 (11)	25 (1)	0	75 (3)
Ceftazidime	65.7 (21)	0	34.3 (11)	100 (11)	0	0	100 (4)	0	0
Ceftriaxona	65.7 (21)	0	34.3 (11)	100 (11)	0	0	75 (3)	25 (1)	0
Cefepime	65.7 (21)	0	34.3 (11)	100 (11)	0	0	100 (4)	0	0
Aztreonam	65.7 (21)	0	34.3 (11)	100 (11)	0	0	100 (4)	0	0
Ertapenem	100 (32)	0	0	100 (11)	0	0	100 (4)	0	0
Meropenem	100 (32)	0	0	100 (11)	0	0	100 (4)	0	0
Amikacina	100 (32)	0	0	100 (11)	0	0	100 (4)	0	0
Gentamicina	90.6 (29)	3.1 (1)	6.2 (2)	90.9 (10)	0	9 (1)	100 (4)	0	0
Ciprofloxacina	71.8 (23)	0	28.1 (9)	100 (11)	0	0	100 (4)	0	0
Tigeciclina	100 (32)	0	0	100 (11)	0	0	100 (4)	0	0
Nitrofurantoina	100 (32)	0	0	100 (11)	0	0	75 (3)	25 (1)	0
Trimetropim/Sulfa.	68.8 (22)	0	31.2 (10)	63.7 (7)	0	36.3 (4)	50 (2)	0	50 (2)

Elaboración propia

La presencia de bacterias resistentes a betalactámicos (**Gráfica 5-10**) aisladas en aguas para uso agrícola, representa una emergencia de salud pública, debido a que, se está evidenciando que estos agentes microbianos no solo se encuentran a nivel hospitalario, sino que se están diseminando de manera gradual en los ambientes, ya sea, por el uso indiscriminado en los sectores agrícolas, sino también por su mala disposición (baja remoción en plantas de tratamiento) y baja degradación de estas moléculas en el ambiente; así mismo, por su alta proliferación en estos efluentes (Calisto *et al.*, 2018); estudios previos han demostrado que aguas residuales que contienen algún tratamiento y son descargadas a aguas superficiales pueden contener patógenos resistentes a antibióticos generando una presión selectiva y proporcionando una diseminación de genes sobre comunidades bacterianas ya existentes (Raven *et al.*, 2019); inclusive si el consumo de antibióticos por la población se redujera, las concentraciones detectadas en sedimentos, aguas subterráneas, aguas residuales persistirían durante largos periodos de tiempo en el medio ambiente, ya sea, por su alta afinidad con la materia orgánica y su baja afinidad con el agua (J. Xu *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015).



Gráfica 5-13. Porcentaje de resistencia a antibióticos betalactámicos de Enterobacterias aisladas en aguas para uso agrícola.

En este estudio, se evaluó el perfil de susceptibilidad de bacterias Gram negativas de interés clínico, donde *E. coli* fue la bacteria predominante representada con un 61%, seguido de *Citrobacter freundii* con un 21% y *Klebsiella* spp., con un 8% relacionándolo con los ensayos realizados en Rumania, México y África donde se obtuvieron porcentajes similares en aguas para uso agrícola (Delgado-Gardea *et al.*, 2016; Marinescu *et al.*, 2015; Obi *et al.*, 2004). Algunos estudios reportan igualmente, que la mayoría de enterobacterias productoras de ESBL muestran una co-resistencia a las fluoroquinolonas, trimetropim y algunos aminoglucósidos (Verburg *et al.*, 2019).

Escherichia coli resultó ser la cepa con un alto porcentaje de resistencia a antibióticos como ampicilina 11 (34.3%), ampicilina sulbactam 5 (15.6%), mientras que para cefazolina, ceftazimide, ceftriaxona y cefepime se observó un porcentaje del 34.3% (**Gráfica 5-13**), mientras que para carbapenémicos se obtuvo un 100% de sensibilidad; cabe destacar que cefalosporinas de tercera generación funcionan como marcador de ESBL, observando como este microorganismo presenta un fenotipo de productor de ESBL (Betalactamasas de espectro extendido). Estudios realizados por Posada-Perlaza *et al.*, 2019 encontraron en el río Bogotá bacterias resistentes a diferentes betalactámicos provenientes de sectores como agrícolas, domésticos y hospitalarios, debido a la deficiencia en los sistemas de tratamiento en aguas residuales y a la mala gestión final de los residuos antibióticos, los cuales podrían aumentar la problemática de resistencia por sus altas concentraciones ($\mu\text{g/L}$) en estos efluentes y también porque podrían contribuir a su propagación mediante elementos plasmídicos (Yim *et al.*, 2013). Por el contrario, bacterias como *Klebsiella pneumoniae* y *K. oxytoca* mostraron tener una alta resistencia a ampicilina (50%) y el último aislamiento bacteriano *Citrobacter freundii*, mostró una resistencia del 100% a cefazolina y 36.3% para trimetropin/sulfametoxazol.

Cabe resaltar que, dentro de este estudio no se pudo detectar la presencia de AmpC en las cepas como *E. coli* y *Klebsiella*, debido a que no se contó con el antibiótico cefoxitin (cefalosporina de segunda generación) el cual funciona como un marcador de producción para AmpC. Por otro lado, para los resultados de *Klebsiella* spp., se pudo observar que el 75% de los aislamientos contienen una resistencia a cefazolina, 25% a ceftriaxona y 100% resistente a ampicilina, ya que, este tipo de bacterias presentan una resistencia natural a las aminopenicilinas, conduciendo a una prevalencia en la hiper expresión de la enzima

SHV-1. Igualmente, se ha reportado que, la mayoría de los aislamientos pertenecientes a *Klebsiella* spp., contienen una alta producción de ESBL, especialmente *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} y *bla*_{SHV}, este último probablemente puede estar mediado por plásmidos conjugativos que contienen un integrón IS26 en *bla*_{SHV-2a}, *bla*_{SHV-5} o *bla*_{SHV-12} que les confiere una alta resistencia a diferentes antibióticos (Jones *et al.*, 2005; Veras *et al.*, 2011) el cual al estar en contacto con microbiota normal puede ser un portador de genes resistentes y movilizarlos mediante elementos extracromosomales.

Por otro lado, se detectó resistencia a cefalosporinas de tercera generación (**Gráfica 5-13**), siendo un dato alarmante y crítico, debido a que estos antibióticos son de práctica clínica y que su uso está siendo indiscriminado por parte de la población (World Health Organization (WHO), 2001, 2016). Igualmente estudios realizados por Liu *et al.*, 2013, sugieren que este tipo de resistencia estaría asociado a integrones de clase 1, mientras que la resistencia a cefalosporinas de cuarta generación como cefemipe se encuentran en mayormente en cepas de origen hospitalario. Igualmente, el aumento de resistencia puede involucrar la presencia de genes como *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{CTX-M}, siendo el gen *bla*_{TEM} el más predominante en el medio ambiente y propagándose mediante elementos móviles de DNA extracromosomal como los plásmidos, transposones e integrones (Osińska *et al.*, 2017; Titilawo, Obi, & Okoh, 2015).

Estudios realizados por Flores, Albornoz, Hurtado, Montaña, & Santa Cruz, 2019 concuerdan con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que, identificaron especies como *E. coli*, *Citrobacter freundii* y *Klebsiella pneumoniae* en aguas superficiales para irrigación, siendo aproximadamente el 40% productoras de ESBL y de AmpC, lo cual genera un riesgo potencial por su presencia debido a que, este tipo de Enterobacterias al ser consumidas, puede facilitar la diseminación de genes ESBL a patógenos oportunistas que se encuentran en el tracto gastrointestinal.

En cuanto, a la producción de AmpC, está puede estar mediada por cromosomas, siendo característico en la familia *Enterobacteriaceae*, donde se puede conferir una resistencia permanente a cefalosporinas de tercera generación y aztreonam (Raphael, Wong, & Riley, 2011; Ruimy *et al.*, 2010); los cuales al estar en contacto con aguas residuales y estiércol, pueden ser portados a animales y humanos; como se observa en la **tabla 5-4**, esta enzima fue detectada principalmente en cepas de *C. freundii*, la cual posee una AmpC-lactamasa

que puede presentar un desafío para su tratamiento, ya que, a nivel *in vivo*, puede ocasionar la expresión de genes resistentes a cefalosporinas de tercera generación y ocasionar fallas terapéuticas (Zhong *et al.*, 2017).

En América Latina se ha evidenciado que en los ambientes acuáticos más del 90% de bacterias son resistentes a algún antibiótico y el 20% resultan tener resistencia a al menos cinco de ellos; siendo transportados a aguas superficiales como se observó en el presente estudio (**Gráfica 5-13**), afectando de manera directa los ecosistemas que entran en contacto con ella y resultando a su vez, una variación genética y una posible aparición de mecanismos de resistencia (Acevedo *et al.*, 2015).

Por otro lado, el sistema VITEK proporcionó resultados en menos de 24 horas, siendo una herramienta útil para la interpretación de resultados, ya que, al ser un sistema cerrado, evita sesgos por el efecto inóculo en comparación con otros métodos fenotípicos que conllevan más tiempo y son más dispendiosos para su montaje. Dentro de este estudio se llevó a cabo, la detección de ESBL por este sistema y fue positiva, ya que, la evaluación de susceptibilidad arrojó resultados significativos para establecer una resistencia a betalactámicos en 11 de las 52 cepas recuperadas, sin tener en cuenta, la resistencia reportada para trimetropin y piperacilin-tazobactam, resaltando la importancia de la búsqueda de estos patógenos en efluentes superficiales, ya que, podría significar que el ambiente juega un papel importante en su propagación (Barancheshme & Munir, 2018; Jaramillo & Restrepo, 2017; Schulz *et al.*, 2019). Es importante destacar, que el uso de esta herramienta automatizada no requiere una confirmación de la detección de ESBL, debido a que, dentro de la tarjeta que se empleó, posee un pocillo de confirmación para su detección.

Cabe mencionar que, de acuerdo al método empleado para determinar bacterias en agua, se puede recuperar o no un gran número de patógenos con algún tipo de resistencia, debido a la interferencia de crecimiento de algunas no enterobacterias y se espera que, mediante metodología molecular, se puedan identificar los genes asociados a ESBL en los microorganismos aislados como *E. coli* y *Klebsiella* spp., en aguas de uso agrícola.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- De acuerdo con los resultados obtenidos el uso de estos efluentes para actividades agrícolas puede representar un riesgo para la salud pública, puesto que contienen altas cargas de *Coliformes totales* y *E. coli*, relacionadas con las descargas de aguas residuales a los cuerpos de agua superficiales, indicando que estas muestras no cumplen con los límites establecidos por la normatividad nacional e internacional.
- El estudio comprobó que los asentamientos urbanos construidos cerca a los canales que se usan para riego agrícola, afectan de manera negativa la calidad del agua para riego.
- Se identificó en las aguas utilizadas para riego, no solamente altos contenidos de materia orgánicas, sino también, la presencia de bacterias como *E. coli*, y *Klebsiella* spp., resistentes a antibióticos betalactámicos.
- Se identificó y cuantificó la presencia de antibióticos como clindamicina, azitromicina, ciprofloxacina y trimetoprima/sulfametoxazol en las aguas de los canales de riego en la zona de estudio, en concentraciones variables, y en algunos casos como Trimetoprima, y Azitromicina superan los valores PNEC (ng/L) establecidos por la Unión Europea (EU COM 2015/495).

6.1 Recomendaciones

- Se recomienda utilizar herramientas moleculares para la identificación de genes de resistencia que están asociados a las bacterias aisladas en la zona y presentan un perfil de susceptibilidad para antibióticos betalactámicos.
- Se recomienda evaluar las hortalizas que están siendo irrigadas con estas aguas agrícolas, para establecer igualmente si existe evidencia de microorganismos resistentes a antimicrobianos y cuáles son los genes que están asociados.
- Se recomienda eliminar las descargas de aguas residuales a los canales de riego del área evaluada, debido a que las aguas contienen altos índices de contaminación y es necesaria la intervención de entes regulatorios para que se ejerzan estas acciones.
- Para mejorar la calidad del agua del Distrito de riego la Ramada, se deben implementar herramientas para el mejoramiento de estos efluentes y así reducir la presencia de contaminantes y bacterias mitigando riesgos de salud pública.

7. BIBLIOGRAFIA

- Acevedo Barrios, R. L., Severiche Sierra, C. A., & Jaimes Morales, J. D. C. (2015). Bacterias resistentes a antibióticos en ecosistemas acuáticos. *Producción Limpia*, 10(2), 160–172. <https://doi.org/10.22507/pml.v10n2a14>
- Aebersold, R., & Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422(March), 198–207. <https://doi.org/10.1038/nature01511>
- Ali, Z. M. (2018). Horizontal gene conjugative transmission acquisition and transfer of antibiotic-resistance genes in bacteria. *Sci. J. Med. Res.*, 2(6), 70–74.
- Alygizakis, N. A., Urík, J., Beretsou, V. G., Kampouris, I., Galani, A., Oswaldova, M., ... Fatta-Kassinou, D. (2020). Evaluation of chemical and biological contaminants of emerging concern in treated wastewater intended for agricultural reuse. *Environment International*, 138(November 2019), 105597. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105597>
- Amos, G. C. A., Zhang, L., Hawkey, P. M., Gaze, W. H., & Wellington, E. M. (2014). Functional metagenomic analysis reveals rivers are a reservoir for diverse antibiotic resistance genes. *Veterinary Microbiology*, 171(3–4), 441–447. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.017>
- Araújo, S., A.T. Silva, I., Tacão, M., Patinha, C., Alves, A., & Henriques, I. (2017). Characterization of antibiotic resistant and pathogenic *Escherichia coli* in irrigation water and vegetables in household farms. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.020>
- Arenas, N. E., & Melo, V. M. (2018). Producción pecuaria y emergencia de antibiótico resistencia en Colombia: Revisión sistemática. *Infectio*, 22(2), 110–119. <https://doi.org/10.22354/in.v22i2.717>
- Argüello, H., & Bustos, M. (2018). *Contamination by Pathogenic Microorganisms in Water used for Agricultural Irrigation on the Sabana de Bogotá , Colombia*.
- Azzam, M. I., Ezzat, S. M., Othman, B. A., & El-Dougdoug, K. A. (2017). Antibiotics resistance phenomenon and virulence ability in bacteria from water environment. *Water Science*, 31(2), 109–121. <https://doi.org/10.1016/j.wsj.2017.10.001>
- Balkhair, K. S. (2016). Microbial contamination of vegetable crop and soil profile in arid regions under controlled application of domestic wastewater. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(1), S83–S92. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.10.029>
- Baquero, F., Martínez, J. L., & Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.006>
- Barancheshme, F., & Munir, M. (2018). Strategies to combat antibiotic resistance in the wastewater treatment plants. *Frontiers in Microbiology*, 8(JAN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02603>
- Bean, T. G., Boxall, A. B. A., Lane, J., Herborn, K. A., Pietravalle, S., & Arnold, K. E. (2014). Behavioural and physiological responses of birds to environmentally relevant concentrations of an antidepressant. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1656). <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0575>
- Becerra-Castro, C., Lopes, A. R., Vaz-Moreira, I., Silva, E. F., Manaia, C. M., & Nunes, O. C. (2015). Wastewater reuse in irrigation: A microbiological perspective on implications in soil fertility and human and environmental health. *Environment International*, 75, 117–135. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.11.001>
- Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., & Larsson, D. G. J. (2017). Environmental factors influencing

- the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, (October 2017), 68–80. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux053>
- Biel-Maeso, M., Corada-Fernández, C., & Lara-Martín, P. A. (2017). Determining the distribution of pharmaceutically active compounds (PhACs) in soils and sediments by pressurized hot water extraction (PHWE). *Chemosphere*, 185, 1001–1010. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.094>
- Bielen, A., Šimatović, A., Kosić-Vukšić, J., Senta, I., Ahel, M., Babić, S., ... Udiković-Kolić, N. (2017). Negative environmental impacts of antibiotic-contaminated effluents from pharmaceutical industries. *Water Research*, 126, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.09.019>
- Bila, D. M., & Dezotti, M. (2007). Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e conseqüências. *Quimica Nova*, 30(3), 651–666. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000300027>
- Bolaños, J., Montero, N., Rodríguez, N., & Sánchez, A. (2015). Calidad de aguas superficiales: estudio de la Quebrada Estero, ubicada en San Ramón. *Pensamiento Actual*, 15(25), 61–76.
- Boman, B. J., Wilson, P. C., & Ontermma, E. A. (2012). *Understanding Water Quality Parameters for Citrus Irrigation and Drainage Systems 1 Obtaining a Water Sample*. 1–11.
- Bougnom, B. P., & Piddock, L. J. V. (2017). Wastewater for Urban Agriculture: A Significant Factor in Dissemination of Antibiotic Resistance. *Environmental Science and Technology*, 51(11), 5863–5864. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b01852>
- Bougnom, B. P., Zongo, C., McNally, A., Ricci, V., Etoa, F. X., Thiele-Bruhn, S., & Piddock, L. J. V. (2019). Wastewater used for urban agriculture in West Africa as a reservoir for antibacterial resistance dissemination. *Environmental Research*, 168(August 2018), 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.09.022>
- Bozaslan, B. S., Cakan, H., Ates, P. S., Alturfan, A. A., & Cengiz, S. (2016). The Examination of the Growth of Escherichia coli (E. coli) Strain on Mac Conkey Agar Prepared with Wastewater. *International Journal of Environmental Science and Development*, 7(11), 793–796. <https://doi.org/10.18178/ijesd.2016.7.11.882>
- Burke, V., Richter, D., Greskowiak, J., Mehrtens, A., Schulz, L., & Massmann, G. (2016). Occurrence of Antibiotics in Surface and Groundwater of a Drinking Water Catchment Area in Germany. *Water Environment Research*, 88(7), 652–659. <https://doi.org/10.2175/106143016x14609975746604>
- Buszewski, B., Rogowska, A., Pomastowski, P., Zloch, M., & Railean-Plugaru, V. (2017). Identification of microorganisms by modern analytical techniques. *Journal of AOAC International*, 100(6), 1607–1623. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0207>
- Calisto Ulloa, N., Gómez Fuentes, C., & Muñoz, P. (2018). Resistencia a antibióticos en bacterias recolectadas en agua de mar en las proximidades de bases antárticas. *Anales Del Instituto de La Patagonia*, 46(3), 29–39. <https://doi.org/10.4067/s0718-686x2018000300029>
- Caltagirone, M., Nucleo, E., Spalla, M., Zara, F., Novazzi, F., Marchetti, V. M., ... Pagani, L. (2017). Occurrence of extended spectrum β -lactamases, KPC-Type, and MCR-1.2-producing enterobacteriaceae from wells, river water, and wastewater treatment plants in Oltrepò Pavese area, Northern Italy. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02232>
- Campo, J., Lorenzo, M., Cammeraat, E. L. H., Picó, Y., & Andreu, V. (2017). Emerging contaminants related to the occurrence of forest fires in the Spanish Mediterranean. *Science of the Total Environment*, 603–604, 330–339. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.005>
- Campo, J., Lorenzo, M., Pérez, F., Picó, Y., Farré, M. I., & Barceló, D. (2016). Analysis of the presence of perfluoroalkyl substances in water, sediment and biota of the Júcar River (E Spain). Sources, partitioning and relationships with water physical characteristics. *Environmental Research*, 147, 503–512. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.03.010>
- Campos, C., Cárdenas, M., & Guerrero, A. (2008). Comportamiento De Los Indicadores De Contaminacion Fecal En Diferente Tipo De Aguas De La Sabana De Bogotá (Colombia) Performance of Faecal Contamination Indicators in Different Type of Waters From the Sabana of Bogotá (Colombia). *Universitas Stuttgart*, 103–108.
- Campos, M. C., Beltrán, M., Fuentes, N., & Moreno, G. (2018). Huevos de helmintos como

- indicadores de contaminación de origen fecal en aguas de riego agrícola, biosólidos, suelos y pastos. (Spanish). *Biomédica: Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 38(1), 42. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3352>
- Candela, L., Fabregat, S., Josa, A., Suriol, J., Vigués, N., & Mas, J. (2007). Assessment of soil and groundwater impacts by treated urban wastewater reuse. A case study: Application in a golf course (Girona, Spain). *Science of the Total Environment*, 374(1), 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.12.028>
- Caovilla, F. A., Sampaio, S. C., Smanhotto, A., Nóbrega, L. H. P., de Queiroz, M. M. F., & Gomes, B. M. (2010). Características químicas de solo cultivado com soja e irrigado com água residuária da suinocultura. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 14(7), 692–697.
- Carlet, J., Rambaud, C., & Pulcini, C. (2012). Alliance contre les bactéries multirésistantes : Sauvons les antibiotiques! *Annales Francaises d'Anesthesie et de Reanimation*, 31(9), 704–708. <https://doi.org/10.1016/j.annfar.2012.07.003>
- Cavaco, L. M., Frimodt-Møller, N., Hasman, H., Guardabassi, L., Nielsen, L., & Aarestrup, F. M. (2008). Prevalence of Quinolone Resistance Mechanisms and Associations to Minimum Inhibitory Concentrations in Quinolone-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Humans and Swine in Denmark. *Microbial Drug Resistance*, 14(2), 163–169. <https://doi.org/10.1089/mdr.2008.0821>
- Celis Bustos, Y. A., Vanesa Rubio, V., Camacho Navarro, M. M., Celis Bustos, Y. A., Rubio, V. V., & Camacho Navarro, M. M. (2017). Perspectiva histórica del origen evolutivo de la resistencia a antibióticos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(2), 105–117. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.69501>
- Chen, X., Vollertsen, J., Nielsen, J. L., Gieraltowska Dall, A., & Bester, K. (2015). Degradation of PPCPs in activated sludge from different WWTPs in Denmark. *Ecotoxicology*, 24(10), 2073–2080. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1548-z>
- Cheng, F., Peng, X., Zhao, P., Yuan, J., Zhong, C., Cheng, Y., ... Zhang, S. (2013). Soil Microbial Biomass, Basal Respiration and Enzyme Activity of Main Forest Types in the Qinling Mountains. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067353>
- Christou, A., Agüera, A., Bayona, J. M., Cytryn, E., Fotopoulos, V., Lambropoulou, D., ... Fatta-Kassinos, D. (2017). The potential implications of reclaimed wastewater reuse for irrigation on the agricultural environment: The knowns and unknowns of the fate of antibiotics and antibiotic resistant bacteria and resistance genes – A review. *Water Research*, Vol. 123, pp. 448–467. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.004>
- Cirelli, G. L., Consoli, S., Licciardello, F., Aiello, R., Giuffrida, F., & Leonardi, C. (2012). Treated municipal wastewater reuse in vegetable production. *Agricultural Water Management*, 104, 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2011.12.011>
- Conti, M. E., Iacobucci, M., Cucina, D., & Mecozzi, M. (2007). Multivariate statistical methods applied to biomonitoring studies. *International Journal of Environment and Pollution*, 29(1–3), 333–343. <https://doi.org/10.1504/ijep.2007.012809>
- Corporación Autonoma Regional de Cundinamarca. (2010). Carta ambiental. *Edición No 25 - ISSN-0213 Diciembre de 2010*, 7. Retrieved from file:///C:/Users/MASTER/Downloads/Carta Ambiental 25.pdf
- Correa, P. A., Lin, L. S., Just, C. L., Hu, D., Hornbuckle, K. C., Schnoor, J. L., & Van Aken, B. (2010). The effects of individual PCB congeners on the soil bacterial community structure and the abundance of biphenyl dioxygenase genes. *Environment International*, 36(8), 901–906. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.07.015>
- Coulter, B. (2011). MicroScan Microbiology Systems. *J Clin Microbiology*, 12.
- Cubides, P. (2018). *Evaluación de un tratamiento para mejorar la calidad del agua utilizada para riego en la Sabana occidental de Cundinamarca*. Retrieved from <http://bdigital.unal.edu.co/70070/2/1018404125.2018.pdf>
- Cui, B., & Liang, S. (2019). Monitoring opportunistic pathogens in domestic wastewater from a pilot-scale anaerobic biofilm reactor to reuse in agricultural irrigation. *Water (Switzerland)*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/w11061283>
- Dalkmann, P., Broszat, M., Siebe, C., Willaschek, E., Sakinc, T., Huebner, J., ... Siemens, J. (2012).

- Accumulation of pharmaceuticals, enterococcus, and resistance genes in soils irrigated with wastewater for zero to 100 years in central Mexico. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045397>
- De Oliveira Marinho, L. E., Filho, B. C., Roston, D. M., Stefanutti, R., & Tonetti, A. L. (2014). Evaluation of the productivity of irrigated eucalyptus grandis with reclaimed wastewater and effects on soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 225(1). <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1830-8>
- DeForest, J. L., Zak, D. R., Pregitzer, K. S., & Burton, A. J. (2004). Atmospheric Nitrate Deposition, Microbial Community Composition, and Enzyme Activity in Northern Hardwood Forests. *Soil Science Society of America Journal*, 68(1), 132. <https://doi.org/10.2136/sssaj2004.1320>
- Delgado-Gardea, M. C. E., Tamez-Guerra, P., Gomez-Flores, R., de la Serna, F. J. Z. D., Eroza-de la Vega, G., Nevárez-Moorillón, G. V., ... Infante-Ramírez, R. (2016). Multidrug-resistant bacteria isolated from surface water in Bassaseachic Falls National Park, Mexico. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(6), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijerph13060597>
- Dickin, S. K., Schuster-Wallace, C. J., Qadir, M., & Pizzacalla, K. (2016). A review of health risks and pathways for exposure to wastewater Use in Agriculture. *Environmental Health Perspectives*, 124(7), 900–909. <https://doi.org/10.1289/ehp.1509995>
- Dou, F. G., Hons, F. M., Ocumpaugh, W. R., Read, J. C., Hussey, M. A., & Muir, J. P. (2013). Soil Organic Carbon Pools Under Switchgrass Grown as a Bioenergy Crop Compared to Other Conventional Crops. *Pedosphere*, 23(4), 409–416. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(13\)60033-8](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(13)60033-8)
- E., B. H. (2015). Nuevas Tecnologías En Diagnóstico Microbiológico: Automatización Y Algunas Aplicaciones En Identificación Microbiana Y Estudio De Susceptibilidad. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26(6), 753–763. <https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2015.11.004>
- Epa, U. S. E. P. (2007). Method 1694 : Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water , Soil , Sediment , and Biosolids by HPLC / MS / MS. *EPA Method*, (December), 77. <https://doi.org/10.1002/etc.3451>
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (2013). *Reutilización del agua en la agricultura: ¿Beneficios para todos?(Informe sobre temas hídricos FAO)*.
- Fatta-Kassinos, D., Kalavrouziotis, I. K., Koukoulakis, P. H., & Vasquez, M. I. (2011). The risks associated with wastewater reuse and xenobiotics in the agroecological environment. *Science of the Total Environment*, 409(19), 3555–3563. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.03.036>
- Fica, A. (2014). *RESISTENCIA ANTIBIÓTICA EN BACILOS*. 25(3), 432–444. DOI:[10.1016/S0716-8640\(14\)70060-4](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(14)70060-4)
- Fierer, N., & Jackson, R. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 103(3), 626–631. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507535103>
- Flores, R., Albornoz, S., Hurtado, J., Montaña, V., & Santa Cruz, A. (2019). *EXTENDED-SPECTRUM B-LACTAMASE AND PLASMID AMPC B-LACTAMASE-PRODUCING ENTEROBACTERIACEAE IN WATER SOURCES FOR IRRIGATION IN MAICA'S ZONE, COCHABAMBA*. 22(2), 15–21. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1817-74332019000200003&lng=es&tlng=es
- Franco-Duarte, R., Černáková, L., Kadam, S., Kaushik, K. S., Salehi, B., Bevilacqua, A., ... Rodrigues, C. F. (2019). Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms—from past to present. *Microorganisms*, 7(5). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050130>
- Frickmann, H., Masanta, W. O., & Zautner, A. E. (2014). Emerging rapid resistance testing methods for clinical microbiology laboratories and their potential impact on patient management. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/375681>
- Ganjugunte, G., Ulery, A., Niu, G., & Wu, Y. (2018). Organic carbon, nutrient, and salt dynamics in saline soil and switchgrass (*Panicum virgatum* L.) irrigated with treated municipal wastewater.

- Land Degradation and Development*, 29(1), 80–90. <https://doi.org/10.1002/ldr.2841>
- Gil, M., Soto, A., Usma, J., & Gutiérrez, O. (2012). *Emerging contaminants in waters: effects and possible treatments* *Contaminantes emergentes em águas, efeitos e possíveis tratamentos*. 7(2), 52–73. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/pml/v7n2/v7n2a05.pdf>
- Gozlan, I., Rotstein, A., & Avisar, D. (2013). Amoxicillin-degradation products formed under controlled environmental conditions: Identification and determination in the aquatic environment. *Chemosphere*, 91(7), 985–992. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.095>
- Grandclément, C., Seyssiecq, I., Piram, A., Wong-Wah-Chung, P., Vanot, G., Tiliacos, N., ... Doumenq, P. (2017). From the conventional biological wastewater treatment to hybrid processes, the evaluation of organic micropollutant removal: A review. *Water Research*, 111, 297–317. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.005>
- Grossberger, A., Hadar, Y., Borch, T., & Chefetz, B. (2014). Biodegradability of pharmaceutical compounds in agricultural soils irrigated with treated wastewater. *Environmental Pollution*, 185, 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.038>
- Guo, R., Xie, W., & Chen, J. (2015). Assessing the combined effects from two kinds of cephalosporins on green alga (*Chlorella pyrenoidosa*) based on response surface methodology. *Food and Chemical Toxicology*, 78, 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.02.007>
- Harrabi, M., Varela Della Giustina, S., Aloulou, F., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D., & Elleuch, B. (2018). Analysis of multiclass antibiotic residues in urban wastewater in Tunisia. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, 10(May), 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2018.05.006>
- Hernández, F., Ibáñez, M., Botero-Coy, A. M., Bade, R., Bustos-López, M. C., Rincón, J., ... Bijlsma, L. (2015). LC-QTOF MS screening of more than 1,000 licit and illicit drugs and their metabolites in wastewater and surface waters from the area of Bogotá, Colombia. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(21), 6405–6416. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8796-x>
- Hou, T. Y., Chiang-Ni, C., & Teng, S. H. (2019). Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27(2), 404–414. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.01.001>
- Huang, X., Zheng, J., Liu, C., Liu, L., Liu, Y., & Fan, H. (2017). Removal of antibiotics and resistance genes from swine wastewater using vertical flow constructed wetlands: Effect of hydraulic flow direction and substrate type. *Chemical Engineering Journal*, 308, 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.09.110>
- Huibers, F. P., & Raschid-Sally, L. (2005). Design in domestic wastewater irrigation. *Irrigation and Drainage*, 54(April), S113–S118. <https://doi.org/10.1002/ldr.191>
- Inyinbor, A. A., Bello, O. S., Oluyori, A. P., Inyinbor, H. E., & Fadiji, A. E. (2019). Wastewater conservation and reuse in quality vegetable cultivation: Overview, challenges and future prospects. *Food Control*, 98(September 2018), 489–500. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.12.008>
- Jablasone, J., Brovko, L. Y., & Griffiths, M. W. (2004). A research note: The potential for transfer of *Salmonella* from irrigation water to tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(3), 287–289. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1646>
- Jaramillo, M. F., & Restrepo, I. (2017). Wastewater reuse in agriculture: A review about its limitations and benefits. *Sustainability (Switzerland)*, Vol. 9. <https://doi.org/10.3390/su9101734>
- Jiménez, B., Mara, D., Carr, R., & Brissaud, F. (2009). Wastewater treatment for pathogen removal and nutrient conservation: Suitable systems for use in developing countries. *Wastewater Irrigation and Health: Assessing and Mitigating Risk in Low-Income Countries*, 146–169. <https://doi.org/10.4324/9781849774666>
- Johanning, A., Moore, E. R. B., Svensson-Stadler, L., Shouche, Y. S., Joakim Larsson, D. G., & Kristiansson, E. (2013). Acquired genetic mechanisms of a multiresistant bacterium isolated from a treatment plant receiving wastewater from antibiotic production. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23), 7256–7263. <https://doi.org/10.1128/AEM.02141-13>
- Jones, L. A., McIver, C. J., Kim, M. J., Rawlinson, W. D., & White, P. A. (2005). The *aadB* gene cassette is associated with *blaSHV* genes in *Klebsiella* species producing extended-spectrum

- β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2), 794–797. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.794-797.2005>
- Kadlec, R. H., & Wallace, S. (2009). Treatment Wetlands. In *Treatment Wetlands*. <https://doi.org/10.1201/9781420012514>
- Ke, C., Li, Z., Liang, Y., Tao, W., & Du, M. (2013). Impacts of chloride de-icing salt on bulk soils, fungi, and bacterial populations surrounding the plant rhizosphere. *Applied Soil Ecology*, 72, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.06.003>
- Kim, K. S., Kam, S. K., & Mok, Y. S. (2015). Elucidation of the degradation pathways of sulfonamide antibiotics in a dielectric barrier discharge plasma system. *Chemical Engineering Journal*, 271, 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.02.073>
- Kulkarni, P., Olson, N. D., Raspanti, G. A., Goldstein, R. E. R., Gibbs, S. G., Sapkota, A., & Sapkota, A. R. (2017). Antibiotic concentrations decrease during wastewater treatment but persist at low levels in reclaimed water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijerph14060668>
- Kuramae, E., Gamper, H., Van Veen, J., & Kowalchuk, G. (2011). Soil and plant factors driving the community of soil-borne microorganisms across chronosequences of secondary succession of chalk grasslands with a neutral pH. *FEMS Microbiology Ecology*, 77(2), 285–294. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01110.x>
- Lagier, J. C., Hugon, P., Khelaifia, S., Fournier, P. E., La Scola, B., & Raoult, D. (2015). The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), 237–264. <https://doi.org/10.1128/CMR.00014-14>
- Lees, K., Fitzsimons, M., Snape, J., Tappin, A., & Comber, S. (2016). Pharmaceuticals in soils of lower income countries: Physico-chemical fate and risks from wastewater irrigation. *Environment International*, 94, 712–723. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.06.018>
- Libutti, A., Gatta, G., Gagliardi, A., Vergine, P., Pollice, A., Beneduce, L., ... Tarantino, E. (2018). *Agro-industrial wastewater reuse for irrigation of a vegetable crop succession under Mediterranean conditions*. 196, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2017.10.015>
- Liu, L. T., Wan, L. H., Song, X. H., Xiong, Y., Jin, S. J., & Zhou, L. M. (2013). Relevance of class 1 integrons and extended-spectrum β -lactamases in drug-resistant *Escherichia coli*. *Molecular Medicine Reports*, 8(4), 1251–1255. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1626>
- Logan, L. K., & Weinstein, R. A. (2017). The epidemiology of Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: The impact and evolution of a global menace. *Journal of Infectious Diseases*, 215(Suppl 1), S28–S36. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw282>
- Lopes, A. R., Faria, C., Prieto-Fernández, Á., Trasar-Cepeda, C., Manaia, C. M., & Nunes, O. C. (2011). Comparative study of the microbial diversity of bulk paddy soil of two rice fields subjected to organic and conventional farming. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(1), 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.09.021>
- Luprano, M. L., De Sanctis, M., Del Moro, G., Di Iaconi, C., Lopez, A., & Levantesi, C. (2016). Antibiotic resistance genes fate and removal by a technological treatment solution for water reuse in agriculture. *Science of the Total Environment*, 571, 809–818. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.055>
- MacFadden, D. R., McGough, S. F., Fisman, D., Santillana, M., & Brownstein, J. S. (2018). Antibiotic resistance increases with local temperature. *Nature Climate Change*, 8(6), 510–514. <https://doi.org/10.1038/s41558-018-0161-6>
- Manson, J., Hancock, L., & Gilmore, M. (2010). Mechanism of chromosomal transfer of *Enterococcus faecalis* pathogenicity island, capsule, antimicrobial resistance, and other traits. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(9), 2161–2164. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000139107>
- Marinescu, F., Marutescu, L., Savin, I., & Lazar, V. (2015). Antibiotic resistance markers among Gram-negative isolates from wastewater and receiving rivers in South Romania. *Romanian Biotechnological Letters*, 20(1), 10055–10069.
- Marrero-moreno, C. M., Mora-Ilanes, M., Hernández-fillor, R. E., Báez-arias, M., García-morey, T., & Espinosa-castaño, I. (2017). *espectro extendido (BLEEs) en instalaciones porcinas de la provincia Matanzas Identification of enterobacteria producing extended-spectrum beta-*

- lactamases (ESBLs) in pig farms in Matanzas province.* 39(3), 1–16.
- Matheyarasu, R., Bolan, N. S., & Naidu, R. (2016). Abattoir Wastewater Irrigation Increases the Availability of Nutrients and Influences on Plant Growth and Development. *Water, Air, and Soil Pollution*, 227(8). <https://doi.org/10.1007/s11270-016-2947-3>
- Merck Millipore. (2014). Agar para coliformes Chromocult. *Darmstadt*, 1–4. Retrieved from http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Chromocult-Coliform-Agar,MM_NF-C164546?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F
- Miao, M., Wen, H., Xu, P., Niu, S., Lv, J., Xie, X., ... Chen, L. (2019). Genetic diversity of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae(CRE) clinical isolates from a Tertiary Hospital in Eastern China. *Frontiers in Microbiology*, 10(JAN), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03341>
- Miller, E. L., Nason, S. L., Karthikeyan, K. G., & Pedersen, J. A. (2016). Root Uptake of Pharmaceuticals and Personal Care Product Ingredients. *Environmental Science and Technology*, 50(2), 525–541. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01546>
- Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial. (2010). *Política Nacional Recurso Hídrico*.
- Mohammed, A. N., & Elbably, M. A. (2016). Technologies of Domestic Wastewater Treatment and Reuse: Options of Application in Developing Countries. *JSM Environ Sci Ecol*, 4(3). Retrieved from <https://www.jscimedcentral.com/EnvironmentalScience/environmentalscience-4-1033.pdf>
- Morosini, M. I., Cercenado, E., Ardanuy, C., & Torres, C. (2012). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos grampositivos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(6), 325–332. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.009>
- Mulder, M., Verbon, A., Lous, J., Goessens, W., & Stricker, B. H. (2019). Use of other antimicrobial drugs is associated with trimethoprim resistance in patients with urinary tract infections caused by *E. coli*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 38(12), 2283–2290. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03672-2>
- Munita, J. M., Arias, C. A., Unit, A. R., & Santiago, A. De. (2016). HHS Public Access. *Mechanisms of Antibiotic Resistance*, 4(2), 1–37. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.Mechanisms>
- Muñoz, I., Gómez-Ramos, M. J., Agüera, A., Fernández-Alba, A. R., García-Reyes, J. F., & Molina-Díaz, A. (2009). Chemical evaluation of contaminants in wastewater effluents and the environmental risk of reusing effluents in agriculture. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 28(6), 676–694. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.03.007>
- Narciso-da-Rocha, C., & Manaia, C. M. (2017). The influence of the autochthonous wastewater microbiota and gene host on the fate of invasive antibiotic resistance genes. *Science of the Total Environment*, 575, 932–940. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.157>
- Narciso-da-Rocha, C., Rocha, J., Vaz-Moreira, I., Lira, F., Tamames, J., Henriques, I., ... Manaia, C. M. (2018). Bacterial lineages putatively associated with the dissemination of antibiotic resistance genes in a full-scale urban wastewater treatment plant. *Environment International*, 118(February), 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.05.040>
- Nesme, J., Cécillon, S., Delmont, T. O., Monier, J. M., Vogel, T. M., & Simonet, P. (2014). Large-scale metagenomic-based study of antibiotic resistance in the environment. *Current Biology*, 24(10), 1096–1100. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.036>
- Nordmann, P., & Poirel, L. (2014). The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(9), 821–830. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12719>
- O 'neill, J. (2015). *Antimicrobials in Agriculture and the Environment: Reducing Unnecessary Use and Waste the Review on Antimicrobial Resistance*. (December).
- Obi, C. L., Bessong, P. O., Momba, M., Potgieter, N., Samie, A., & Igumbor, E. O. (2004). Profiles of antibiotic susceptibilities of bacterial isolates and physico-chemical quality of water supply in rural Venda communities, South Africa. *Water SA*, 30(4), 515–519. <https://doi.org/10.4314/wsa.v30i4.5104>
- Olson, R. P., Harrell, L. J., & Kaye, K. S. (2009). Antibiotic resistance in urinary isolates of *Escherichia coli* from college women with urinary tract infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(3), 1285–1286. <https://doi.org/10.1128/AAC.01188-08>

- Ortiz, N. (2018). EPs Antibiotics: Photodecomposition and Biocarbon Adsorption. *Emerging Pollutants - Some Strategies for the Quality Preservation of Our Environment*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76893>
- Osińska, A., Korzeniewska, E., Harnisz, M., & Niestępski, S. (2017). The prevalence and characterization of antibiotic-resistant and virulent *Escherichia coli* strains in the municipal wastewater system and their environmental fate. *Science of the Total Environment*, 577, 367–375. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.203>
- Ospina Zuñiga, O., García Cobas, G., Gordillo Rivera, J., & Tovar Hernández, K. (2016). Evaluación de la turbiedad y la conductividad ocurrida en temporada seca y de lluvia en el río Combeima (Ibagué, Colombia). *Ingeniería Solidaria*, 12(19), 19–36. <https://doi.org/10.16925/in.v12i19.1191>
- Øvreås, V. T. & L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol*, 5, 240–245. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00324-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00324-7)
- Pachepsky, Y., Shelton, D., Dorner, S., & Whelan, G. (2016). Can E. Coli or thermotolerant coliform concentrations predict pathogen presence or prevalence in irrigation waters? *Critical Reviews in Microbiology*, 42(3), 384–393. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.954524>
- Pal, A., Gin, K. Y. H., Lin, A. Y. C., & Reinhard, M. (2010). Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Science of the Total Environment*, 408(24), 6062–6069. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.09.026>
- Pandey, P. ., & Soupir, M. (2013). Assessing the Impacts of E. coli Laden Streambed Sediment on E. coli Loads over a Range of Flows and Sediment Characteristics. *Journal of the American Water Resources Association*, 49(6), 1261–1269. <https://doi.org/10.1111/jawr.12079>
- Panthi, S., Sapkota, A. R., Raspanti, G., Allard, S. M., Bui, A., Craddock, H. A., ... Sapkota, A. (2019). Pharmaceuticals, herbicides, and disinfectants in agricultural water sources. *Environmental Research*, 174(August 2018), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.04.011>
- Paola, D., Velandia, L., Inés, M., Caycedo, T., Fernando, C., & Quiroga, P. (2016). Genes de resistencia en bacilos Gram negativos : Impacto en la salud pública en. *Universidad y Salud*, 18(1), 190. <https://doi.org/10.22267/rus.161801.30>
- Park, J. Y., & Huwe, B. (2016). Effect of pH and soil structure on transport of sulfonamide antibiotics in agricultural soils. *Environmental Pollution*, 213, 561–570. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.01.089>
- Park, S., Szonyi, B., Gautam, R., Nightingale, K., Anciso, J., & Ivanek, R. (2012). Risk factors for microbial contamination in fruits and vegetables at the preharvest level: A systematic review. *Journal of Food Protection*, 75(11), 2055–2081. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-160>
- Pazda, M., Kumirska, J., Stepnowski, P., & Mulkiewicz, E. (2019). Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems – A review. *Science of the Total Environment*, 697, 134023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134023>
- Perry, J. D. (2017). A decade of development of chromogenic culture media for clinical microbiology in an era of molecular diagnostics. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(2), 449–479. <https://doi.org/10.1128/CMR.00097-16>
- Pincus, D. H. (2010). Microbial identification using the bioMérieux VITEK® 2 system. *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*, 1–32.
- PIVIĆ, R., STANOJKOVIĆ-SEBIĆ, A., MAKSIMOVIĆ, J., JOŠIĆ, D., & DINIĆ, Z. (2018). THE QUALITY OF WATER USED FOR IRRIGATION OF AGRICULTURAL SOIL IN THE BASIN OF RIVER GREAT MORAVA. *AgroLife Scientific*, 6(1), 188–194. <https://doi.org/10.4102/satnt.v4i4.1052>
- Porse, A., Gumpert, H., Kubicek-Sutherland, J. Z., Karami, N., Adlerberth, I., Wold, A. E., ... Sommer, M. O. A. (2017). Genome Dynamics of *Escherichia coli* during Antibiotic Treatment: Transfer, Loss, and Persistence of Genetic Elements In situ of the Infant Gut. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(April), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00126>
- Posada-Perlaza, C. E., Ramírez-Rojas, A., Porras, P., Adu-Oppong, B., Botero-Coy, A. M., Hernández, F., ... Zambrano, M. M. (2019). Bogotá River anthropogenic contamination alters

- microbial communities and promotes spread of antibiotic resistance genes. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48200-6>
- Qian, Y., & Lin, Y. (2019). Comparison of soil chemical properties prior to and five to eleven years after recycled water irrigation. *Journal of Environmental Quality*, 48(6), 1758–1765. <https://doi.org/10.2134/jeq2019.03.0132>
- Qiao, M., Ying, G. G., Singer, A. C., & Zhu, Y. G. (2018). Review of antibiotic resistance in China and its environment. *Environment International*, Vol. 110, pp. 160–172. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.10.016>
- Rahimi, M. H., Kalantari, N., Sharifidoost, M., & Kazemi, M. (2018). Quality assessment of treated wastewater to be reused in agriculture. *Global Journal of Environmental Science and Management*, 4(2), 217–230. <https://doi.org/10.22034/gjesm.2018.04.02.009>
- Ramirez, K. S., Craine, J. M., & Fierer, N. (2012). Consistent effects of nitrogen amendments on soil microbial communities and processes across biomes. *Global Change Biology*, 18(6), 1918–1927. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2012.02639.x>
- Ranjard, L., & Richaume, A. (2001). Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Research in Microbiology*, 152(8), 707–716. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01251-7](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01251-7)
- Raphael, E., Wong, L. K., & Riley, L. W. (2011). Extended-spectrum beta-lactamase gene sequences in Gram-negative saprophytes on retail organic and nonorganic spinach. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), 1601–1607. <https://doi.org/10.1128/AEM.02506-10>
- Ravea, A. F. G., Kussb, A. V., Peila, G. H. S., Ladeirac, S. R., Villarreal, J. P. V., & Nascentee, P. S. (2019). Biochemical identification techniques and antibiotic susceptibility profile of lipolytic ambient bacteria from effluents. *Brazilian Journal of Biology*, 79(4), 555–565. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.05616>
- Raven, K. E., Ludden, C., Gouliouris, T., Blane, B., Naydenova, P., Brown, N. M., ... Peacock, S. J. (2019). Genomic surveillance of *Escherichia coli* in municipal wastewater treatment plants as an indicator of clinically relevant pathogens and their resistance genes. *Microbial Genomics*, 5(5). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000267>
- Rice, L. B. (2008). Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(8), 1079–1081. <https://doi.org/10.1086/533452>
- Roberson, E. B., & Firestone, M. K. (1993). *Activity-Soil Response Saline Water Irrigation*. 25(6), 693–697.
- Rock, C. M., Brassill, N., Dery, J. L., Carr, D., McLain, J. E., Bright, K. R., & Gerba, C. P. (2019). Review of water quality criteria for water reuse and risk-based implications for irrigated produce under the FDA Food Safety Modernization Act, produce safety rule. *Environmental Research*, 172(December 2018), 616–629. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.12.050>
- Rodriguez-Mozaz, S., Chamorro, S., Marti, E., Huerta, B., Gros, M., Sánchez-Melsió, A., ... Balcázar, J. L. (2015). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Research*, 69, 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.021>
- Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P. C., Lauber, C. L., Lozupone, C., Caporaso, J. G., ... Fierer, N. (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME Journal*, 4(10), 1340–1351. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.58>
- Ruimy, R., Meziane-Cherif, D., Momcilovic, S., Arlet, G., Andremon, A., & Courvalin, P. (2010). RAHN-2, a chromosomal extended-spectrum class A β -lactamase from *Rahnella aquatilis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(8), 1619–1623. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq178>
- Sainz, S., Basile, G., & Zandanel, L. (2017). Microbiología Aplicada: Sistemas de Automatización en Microbiología MicroScan. *Bioreview*, 6(72), 84.
- Sakhno, NgGunar, O. (2016). *Review Article Mathews Journal of Pharmaceutical Science Microbial Identification Methods in Pharmaceutical Analysis: Comparison and Evaluation*. 1, 1–8.
- Schulz, J., Kemper, N., Hartung, J., Janusch, F., Moring, S. A. I., & Hamscher, G. (2019). Analysis of fluoroquinolones in dusts from intensive livestock farming and the co-occurrence of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 9(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41528-z>

- Schwartz, T., Kohnen, W., Bernd, J., & Obst, U. (2003). *Detection of Antibiotic Resistant Bacteria and Their Resistance Genes in Wastewater, Surface Water and Drinking Water Biofilms*. 43. DOI: [10.1111/j.1574-6941.2003.tb01073.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2003.tb01073.x)
- Seid, R., & Drechsel, P. (2009). Cost-effectiveness analysis of interventions for diarrhoeal disease reduction among consumers of wastewater-irrigated lettuce in Ghana. In *Wastewater Irrigation and Health: Assessing and Mitigating Risk in Low-income Countries*. <https://doi.org/10.4324/9781849774666>
- Silva, J., Torres, P., & Madera, C. (2008). Reuso de aguas residuales domésticas en agricultura . Una revisión Domestic wastewater reuse in agriculture . A review. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 347–359. Retrieved from <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/13521/14204>
- Singh, A. L. (2016). *Nitrate and Phosphate Contamination in Water and Possible Remedial*. (February 2013).
- Smit, E., Leeflang, P., Gommans, S., Van Den Broek, J., Van Mil, S., & Wernars, K. (2001). Diversity and Seasonal Fluctuations of the Dominant Members of the Bacterial Soil Community in a Wheat Field as Determined by Cultivation and Molecular Methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2284–2291. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2284-2291.2001>
- Sollicec, M., Roy-Lachapelle, A., Gasser, M. O., Coté, C., Génereux, M., & Sauvé, S. (2016). Fractionation and analysis of veterinary antibiotics and their related degradation products in agricultural soils and drainage waters following swine manure amendment. *Science of the Total Environment*, 543, 524–535. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.061>
- Solomon, E., Matthews, K. R., Solomon, E. B., Yaron, S., & Matthews, K. R. (2014). *Transmission of Escherichia coli O157 : H7 from Contaminated Manure and Irrigation Water to Lettuce Plant Tissue and ... Transmission of Escherichia coli O157 : H7 from Contaminated Manure and Irrigation Water to Lettuce Plant Tissue and Its Subsequent In*. 68(August), 397–400. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.1.397>
- Song, I., Stine, S. W., Choi, C. Y., & Gerba, C. P. (2006). Comparison of crop contamination by microorganisms during subsurface drip and furrow irrigation. *Journal of Environmental Engineering*, 132(10), 1243–1248. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(2006\)132:10\(1243\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(2006)132:10(1243))
- Tafur, D., & Villegas, V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio*, 12(3), 217–226. https://doi.org/http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/mecanismos_de_resistencia_a_los_antibioticos_en_bacterias_gram_negativas.pdf
- Tang, Q., Song, P., Li, J., Kong, F., Sun, L., & Xu, L. (2016). Control of antibiotic resistance in China must not be delayed: The current state of resistance and policy suggestions for the government, medical facilities, and patient. *BioScience Trends*, 10(1), 1–6. <https://doi.org/10.5582/bst.2016.01034>
- Tängdén, T., & Giske, C. G. (2015). Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *Journal of Internal Medicine*, 277(5), 501–512. <https://doi.org/10.1111/joim.12342>
- Tessaro, D., Sampaio, S. C., & Castaldelli, A. P. A. (2016). Wastewater use in agriculture and potential effects on meso and macrofauna soil. *Ciência Rural*, 46(6), 976–983. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20141648>
- Thebo, A. L., Drechsel, P., Lambin, E. F., & Nelson, K. L. (2017). A global, spatially-explicit assessment of irrigated croplands influenced by urban wastewater flows. *Environmental Research Letters*, 12(7). <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aa75d1>
- Thomas, C. M., & Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 711–721. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1234>
- Titilawo, Y., Obi, L., & Okoh, A. (2015). Antimicrobial resistance determinants of Escherichia coli isolates recovered from some rivers in Osun State, South-Western Nigeria: Implications for public health. *Science of the Total Environment*, 523, 82–94. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.095>

- Unesco. (2015). Agua para un mundo sostenible. *Informe de Las Naciones Unidas Sobre Los Recursos Hídricos En El Mundo*, 1–8.
- Unesco. (2017). *Aguas residuales*. Retrieved from <http://unesdoc.unesco.org/images/0024/002476/247647s.pdf>
- US Environmental Protection Agency Office of Pesticide. (2016). Standard Operating Procedure for VITEK 2 Compact: Use, Maintenance and Quality Control Procedures. EPA, 15. Retrieved from <http://www.epa.gov/opp00001/methods/atmpmethods/QC-23-01.pdf>
- Van-camp, L., Bujarrabal, B., Gentile, A. R., Jones, R. J. a, Montanarella, L., Olazabal, C., & Selvaradjou, S. (2004). Reports of the Technical Working Groups Volume - Iv. *Management, VI*, 1–163.
- Váradi, L., Luo, J. L., Hibbs, D. E., Perry, J. D., Anderson, R. J., Orenge, S., & Groundwater, P. W. (2017). Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: Past, present, and future. *Chemical Society Reviews*, 46(16), 4818–4832. <https://doi.org/10.1039/c6cs00693k>
- Varela, A. R., & Manaia, C. M. (2013). Human health implications of clinically relevant bacteria in wastewater habitats. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(6), 3550–3569. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1594-0>
- Vasudevan, D., Bruland, G. L., Torrance, B. S., Upchurch, V. G., & MacKay, A. A. (2009). pH-dependent ciprofloxacin sorption to soils: Interaction mechanisms and soil factors influencing sorption. *Geoderma*, 151(3–4), 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2009.03.007>
- Veras, D. L., Alves, L. C., Brayner, F. A., Guedes, D. R. D., Maclel, M. A. V., Rocha, C. R. C., & De Souza Lopes, A. C. (2011). Prevalence of the blaSHV gene in Klebsiella pneumoniae Isolates obtained from hospital and community infections and from the microbiota of healthy individuals in Recife, Brazil. *Current Microbiology*, 62(5), 1610–1616. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9899-z>
- Verburg, I., García-Cobos, S., Leal, L. H., Waar, K., Friedrich, A. W., & Schmitt, H. (2019). Abundance and antimicrobial resistance of three bacterial species along a complete wastewater pathway. *Microorganisms*, 7(9). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090312>
- Vila, J., Martí, S., & Sánchez-Céspedes, J. (2007). Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(6), 1210–1215. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl509>
- Wang, Z., Li, J., & Li, Y. (2017). Using Reclaimed Water for Agricultural and Landscape Irrigation in China: a Review. *Irrigation and Drainage*, 66(5), 672–686. <https://doi.org/10.1002/ird.2129>
- Wasim Aktar, M., Paramasivam, M., Ganguly, M., Purkait, S., & Sengupta, D. (2010). Assessment and occurrence of various heavy metals in surface water of Ganga river around Kolkata: A study for toxicity and ecological impact. *Environmental Monitoring and Assessment*, 160(1–4), 207–213. <https://doi.org/10.1007/s10661-008-0688-5>
- Wellington, E. M. H., Boxall, A. B. A., Cross, P., Feil, E. J., Gaze, W. H., Hawkey, P. M., ... Williams, A. P. (2013). The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(2), 155–165. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70317-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70317-1)
- WHO. (2014). World Urbanization Prospects: The 2014 Revision, Highlights (ST/ESA/SER.A/352). In *New York, United*. <https://doi.org/10.4054/DemRes.2005.12.9>
- WHO. (2017). Antibacterial Agents in Clinical Development: An Analysis of the Clinical Development Pipeline, including Tuberculosis. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 30(C), 101–110. [https://doi.org/10.1016/S0065-7743\(08\)60924-0](https://doi.org/10.1016/S0065-7743(08)60924-0)
- Williams-Nguyen, J., Brett Sallach, J., Bartelt-Hunt, S., Boxall, A. B., Durso, L. M., McLain, J. E., ... Zilles, J. L. (2016). Antibiotics and antibiotic resistance in agroecosystems: State of the science. *Journal of Environmental Quality*, 45(2), 394–406. <https://doi.org/10.2134/jeq2015.07.0336>
- Woodford, N., & Ellington, M. J. (2007). The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(1), 5–18. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01492.x>
- World Health Organization (WHO). (2001). Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*, 10(4), 284–294. <https://doi.org/10.1590/s1020-49892001001000014>
- World Health Organization (WHO). (2006). Wastewater use in Agriculture. *Guidelines For the Safe*

- Use of Wastewater, Excreta and Greywater*, 2, 191. [WHO | Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater - Volume 2](#)
- World Health Organization (WHO). (2016). *Plan De Acción Mundial Sobre La Resistencia a Los Antimicrobianos*. [OMS | Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos \(who.int\)](#)
- Wu, R. S. S. (1999). Eutrophication, water borne pathogens and xenobiotic compounds: Environmental risks and challenges RID B-4203-2010. *Marine Pollution Bulletin*, 39(1–12), 11–22. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(99\)00014-4](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(99)00014-4)
- Xu, C., Wang, Y., Bryngelson, P., Sosic, Z., Dalton, D., & Dithiothreitol, D. T. T. (2019). *Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical Research*. 1140, 289–298. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-15950-4>
- Xu, J., Xu, Y., Wang, H., Guo, C., Qiu, H., He, Y., ... Meng, W. (2015). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river. *Chemosphere*, 119, 1379–1385. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.040>
- Yi, K., Wang, D., QiYang, Li, X., Chen, H., Sun, J., ... Zeng, G. (2017). Effect of ciprofloxacin on biological nitrogen and phosphorus removal from wastewater. *Science of the Total Environment*, 605–606, 368–375. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.215>
- Yim, G., Kwong, W., Davies, J., & Miao, V. (2013). Complex integrons containing qnrB4-ampC (blaDHA-1) in plasmids of multidrug-resistant *Citrobacter freundii* from wastewater. *Can. J. Microbiology*, 116(November 2012), 110–116. DOI: [10.1139/cjm-2012-0576](https://doi.org/10.1139/cjm-2012-0576)
- Zhang, S., Han, B., Gu, J., Wang, C., Wang, P., Ma, Y., ... He, Z. (2015). Fate of antibiotic resistant cultivable heterotrophic bacteria and antibiotic resistance genes in wastewater treatment processes. *Chemosphere*, 135, 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.001>
- Zhong, C., Nelson, M., Cao, G., Sadowsky, M. J., & Yan, T. (2017). Complete genome sequence of *Citrobacter freundii* 705SK3, an OXA-48-encoding wastewater isolate. *American Society for Microbiology*, 5(33), 4–5. doi: [10.1128/genomeA.00842-17](https://doi.org/10.1128/genomeA.00842-17)

8. ANEXOS

Anexo 1.

Factores de carga (Loading) del Análisis Principal de Componentes en Temporada Seca

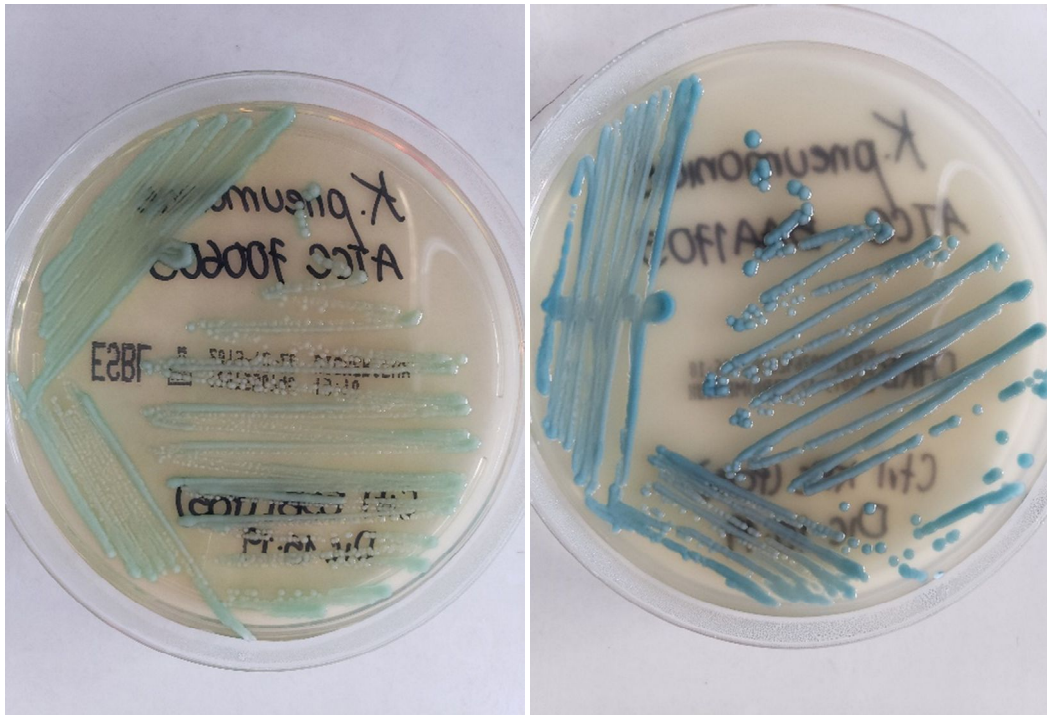
VARIABLES	FACTOR 1	FACTOR 2	FACTOR 3
Nitratos	0,3235	-0,0053	-0,2102
Sulfatos	-0,1220	0,0189	0,1509
Fosfatos	0,6423	-0,5185	0,1790
Cloruros	0,4098	-0,7219	0,2078
C. Totales (Log NMP/100mL)	0,7813	0,2415	-0,3809
<i>E. coli</i> (Log NMP/100mL)	0,7979	0,2413	-0,3766
OD (mg/LO ₂)	-0,0498	0,2609	-0,5568
EC (μS/cm)	0,6253	-0,4038	0,2077
pH	0,4285	0,5643	-0,1211
T (°C)	0,7679	-0,0785	-0,3790
DQO	0,4962	0,4851	0,6651
DBO ₅	0,5232	0,5280	0,6355
COT	0,5254	-0,3555	-0,0190
S.S.T.	0,0619	0,0881	0,2772

Anexo 2.
Factores de carga (Loading) del Análisis Principal de Componentes
en Temporada Lluvia

VARIABLES	FACTOR 1	FACTOR 2	FACTOR 3
Nitritos	0,256080	-0,685086	0,115819
Nitratos	0,165240	-0,648097	0,101762
Sulfatos	-0,004942	-0,448158	0,623148
Fosfatos	-0,523566	-0,318555	0,508300
Cloruros	-0,140444	-0,460995	0,588636
C. Totales (Log NMP/100mL)	0,256274	-0,645376	-0,356798
<i>E. coli</i> (Log NMP/100mL)	0,358021	-0,580838	-0,375158
OD (mg/LO ₂)	0,493005	-0,061521	-0,397001
EC (μS/cm)	0,248034	-0,548238	0,321902
pH	0,692166	-0,126776	-0,241754
T (°C)	0,515370	-0,592722	-0,060890
DQO	-0,754853	-0,419661	-0,427058
DBO ₅	-0,531569	-0,388776	-0,564989
COT	-0,850670	-0,373463	-0,253771
S.S.T.	-0,867943	-0,161906	-0,008272

Anexo 3.

Cepas control *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 positiva para ESBL y *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA1705 positiva para KPC.



Anexo 4.

Placa de metal conductora para la identificación bacteriana por medio de MALDI-TOF.



pacientes: 21 Lista de los resultados para revisar

Escherichia coli. Posibilidad de Shigella spp o Escherichia coli O157.

Apellido	N° Muestra	Tipo de muestra	Nombre Microorganismo	Nivel de confianza	Nivel de confianza
	5-1		Enterobacter cloacae	50.0	⚠
	6-1		Citrobacter braaki	99.9	✅
	7-1		Citrobacter braaki	99.9	✅
	8-1		Escherichia coli	99.9	✅
	9-1		Escherichia coli	99.9	✅

Página 3 de 3

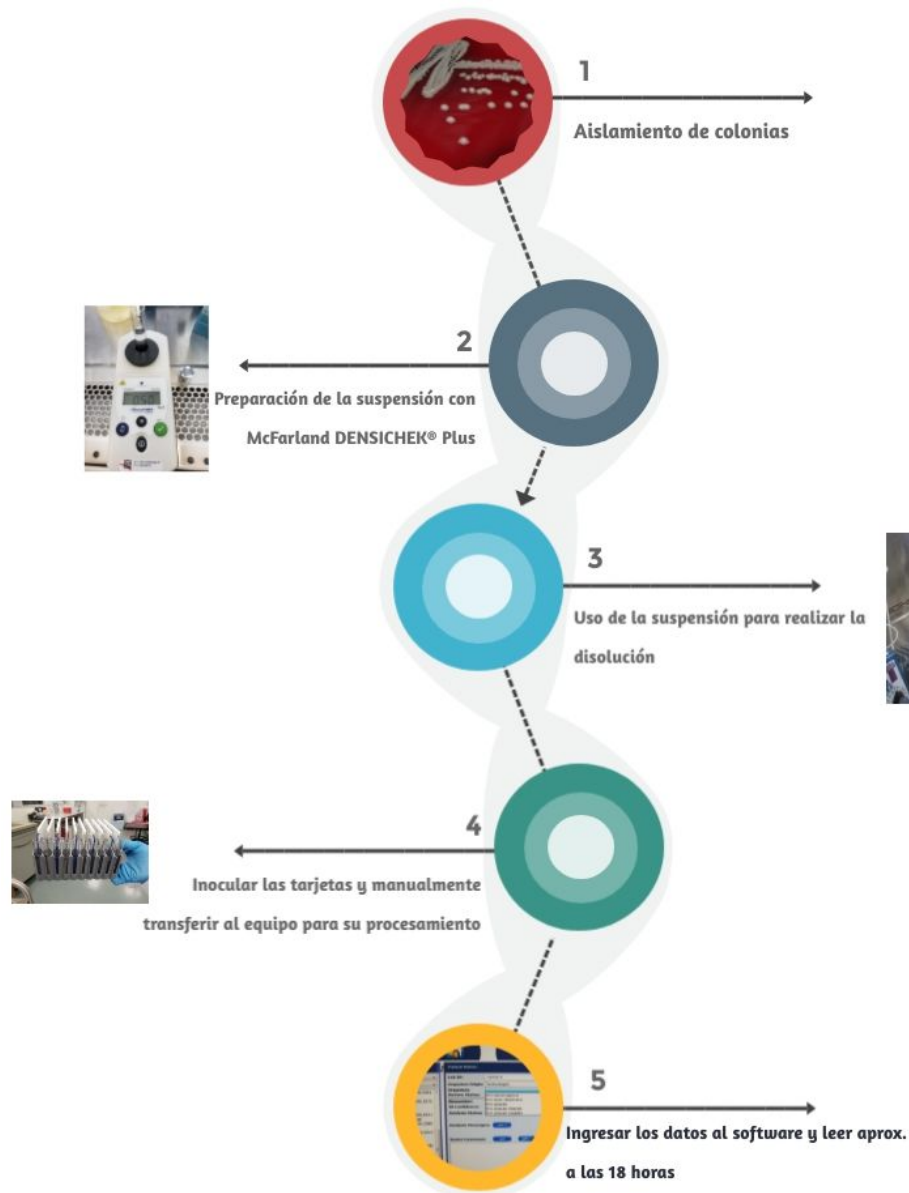
Enviar los resultados seleccionados Enviar todos los resultados Alto Nivel Descartar

elo

Anexo 5.
Montaje de la técnica automatizada VITEK® 2 para determinar el perfil de resistencia a antibióticos.

VITEK 2 COMPACT

Procedimiento estándar



Consolidación de todos los datos físico químicos en temporada lluvia

Sitios	Nitratos	Sulfatos	Fosfatos	Cloruros	OD (mg/L O ₂)	EC (μS/cm)	pH	Temperatura	DQO	DBO ₅	COT	S.S.T.
Sitio 1	<0,1	93,44	4,9	85,98	0,82	863	6,6	15,9 °C	790	513	20,4	145
Sitio 1	<0,1	118,98	5,04	88,8	0,54	828	6,78	15,5 °C	82	53	36,8	66
Sitio 1	<0,1	41,5	3,459	74,4	1,48	549	7,33	16,5 °C	33	12	9,4	64
Sitio 1	<0,1	<0,1	0,5152	0,9	0,62	573	7,56	15,1 °C	39	31	13,1	98
Sitio 1	<0,1	123,4	4,3085	97,3	0,77	725	6,85	16 °C	46	31	12	20
Sitio 1	<0,1	123,9	3,833	73,7	0,69	798	7,73	17 °C	41	31	8,3	10
Sitio 2	0,12	4,24	0,54	48,36	0,47	482	6,6	15,9 °C	1660	720	296,5	3045
Sitio 2	0,2	8,5	<0,2	104,2	0,33	460	6,78	15,5 °C	2100	1042	307,8	4130
Sitio 2	3,6	129,3	15,2122	87	0,22	601	6,2	13,2 °C	2100	316	712,5	19950
Sitio 2	<0,1	0,53	<0,2	0,66	1,21	507	7,18	12 °C	246	156	88,9	672
Sitio 2	<0,1	15	0,836	48,7	0,18	464	6,58	14,7 °C	1200	786	300	8130
Sitio 2	0,7	35,2	3,007	53,9	0,43	541	6,85	13,5 °C	348	231	72	1360
Sitio 3	0,92	188,6	5,4	111,8	0,75	592	7,07	16,4 °C	80	57	30	32
Sitio 3	0,1	93,4	2,08	26,3	1,45	590	6,67	14,3 °C	95	50	36,8	46
Sitio 3	<0,1	2,3	6,2094	76,8	0,6	705	6,5	14,9 °C	45	27	11,6	62
Sitio 3	1	16,3	1,4762	27,8	0,6	681	7,43	14,5 °C	42	29	12,4	80
Sitio 3	3,4	67	<0,2	68	0,22	705	6,79	14,9 °C	51	31	13,9	20
Sitio 3	<0,1	121,2	4,9056	61,8	0,58	710	7,48	14,5 °C	40	27	10,5	
Sitio 4	3,54	141,2	3,6	109	0,99	1130	7,28	19,3 °C	88	60	33	33
Sitio 4	<0,1	222,96	1,52	50,76	0,65	857	6,81	15,8 °C	88	49	29,3	32
Sitio 4	<0,1	70	2,511	0,08	0,83	1191	7,05	15,1 °C	31	18	9	43

Sitio 4	8	54,9	<0,2	77,8	1,56	740	7,32	16,5 °C	47	29	13,9	37
Sitio 4	3,3	65,7	3,2565	67,2	0,41	780	6,8	15,6 °C	34	26	7,5	13
Sitio 4	12,1	79,1	3,8194	91,5	1,54	630	8,04	17,4 °C	34	21	12	12
Sitio 5	2,32	44,32	0,056	119	2,85	824	7,4	18,5 °C	83	59	30,8	36
Sitio 5	0,42	47,3	<0,2	68,9	3,85	846	6,65	18 °C	72	42	32,7	28
Sitio 5	5,8	107,7	4,9748	130,7	1,23	861	7,12	16,7 °C	352	157	95,3	438
Sitio 5	1	12,6	2,0376	13	4,29	438	7,95	17,4 °C	40	25	13,5	70
Sitio 5	0,9	21,7	<0,2	12,7	1,97	222	6,9	15,1 °C	25	18	4,9	8
Sitio 5	0,2	30,3	<0,2	20	2,41	336	8,01	16,2 °C	29	19	11,3	15
Sitio 6	5,1	106,2	2,8	56	1,8	915	7,54	19,1 °C	1370	720	247,7	123
Sitio 6	4,8	116,8	2,14	25,01	3,26	856	7,3	18,5 °C	1800	971	266,5	118
Sitio 6	<0,1	26,5	<0,2	55,6	0,93	1179	7,3	17,4 °C	600	370	158,3	204
Sitio 6	0,7	107	2,8496	51,9	1,23	770	7,8	15,4 °C	110	101	28,1	128
Sitio 6	<0,1	35,3	1,712	30,5	1,82	475	6,97	16,3 °C	197	126	66	164
Sitio 6	<0,1	60,8	2,6962	47,9	1,88	622	8,09	17,1 °C	72	50	20,3	47

Anexo 7.
Consolidación de todos los datos físico químicos en temporada seca

Sitios	Nitratos	Sulfatos	Fosfatos	Cloruros	OD (mg/L O ₂)	EC (µS/cm)	pH	Temperatura	DQO	DBO ₅	COT	S.S.T.
Sitio 1	<0,1	190,2	3,4	64,8	0,9	814	6,83	14,4	82	49	28,5	14
Sitio 1	0,7566	236,2	1,28	57,8	1,23	936	6,46	13,5	113	73	36	121
Sitio 1	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	1,1	942	6,61	14	100	60	28,5	66
Sitio 1	0,1	315,2	0,5798	64,8	0,79	943	6,34	13,7	75	50	27,8	16
Sitio 1	0,3	323,9	1,1674	66,2	0,96	935	6,38	13,9	67	30	25,1	12
Sitio 1	0,2	304	3,1188	85,3	1,16	828	6,94	14,1	52	37	19,5	<5
Sitio 1	<0,1	50,5	8,1458	114,7	0,28	799	6,53	12,3	406	252	137	1552
Sitio 1	<0,1	194,8	1,0302	75,4	1,77	750	6,76	13,4	63	41	22	183
Sitio 1	<0,1	222,3	2,348	79	0,78	781	7,55	14	23	13	5,6	12
Sitio 1	<0,1	189,1	1,5388	68,7	0,88	805	6,63	13	36	23	10,1	20
Sitio 2	<0,1	48,8	0,98	62,2	0,2	573	7,14	13,3	1440	943	35,3	32640
Sitio 2	0,5718	168,06	2,4354	42,9086	1,3	713	6,74	12,8	2100	1287	40,5	810
Sitio 2	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	0,57	755	6,86	12,1	1960	1149	35,7	458
Sitio 2	0,1	98,8	4,8922	82,4	0,51	807	6,57	13,2	3320	1451	45,8	105
Sitio 2	0,3	270,8	0,5156	57,4	0,48	827	6,65	13	2150	1293	45	372
Sitio 2	0,9	41,6	<0,2	12,1	0,26	850	7,01	13,7	820	462	57,4	1332
Sitio 2	0,1	99,8	1,4456	58,2	0,73	603	6,8	13,3	93	57	26,6	38
Sitio 2	0,2	44,5	5,044	111,2	0,32	794	6,6	14,8	381	299	134,7	1040
Sitio 2	0,2	84,9	<0,2	65,6	0,92	651	6,42	12,8	48	32	12	102
Sitio 2	0,2	107	2,0692	62,4	0,62	660	6,09	15,3	45	24	11,3	95
Sitio 3	0,1	104,4	0,96	43,2	0,29	854	6,6	14,6	83	55	28,5	14

Sitio 3	0,6076	167,9094	<0,2	39,536	2,26	871	6,65	13,2	84	59	20,6	31
Sitio 3	<0,1	181,298	<0,2	36,3728	0,63	910	6,71	14,5	71	54	11,6	21
Sitio 3	0,1	256,2	1,2296	58,9	0,54	856	6,65	14,3	84	49	31,5	41
Sitio 3	<0,1	244,9	0,8312	58,3	0,59	837	6,57	13,2	78	47	26,6	48
Sitio 3	0,8	37,1	<0,2	18,6	0,55	590	6,86	15,5	60	37	26,3	165
Sitio 3	0,2	60,6	1,5264	79,2	1,13	689	6,89	15,1	93	59	26,6	16
Sitio 3	0,2	98	1,1566	69,5	1,16	616	6,69	13	282	151	31,1	116
Sitio 3	0,1	100,6	<0,2	64,6	1,1	620	7,36	13,1	52	34	16,1	38
Sitio 3	<0,1	189,1	1,0582	68,7	0,68	673	6,36	14,4	41	31	9,4	20
Sitio 4	<0,1	259,8	0,36	50,8	2,89	874	6,8	15,6	95	65	26,6	14
Sitio 4	0,5412	178,312	1,0428	51,784	1,86	910	6,9	14,7	85	53	15,4	11
Sitio 4	<0,1	69,781	<0,2	17,9756	4,29	928	6,9	15	81	47	17,6	25
Sitio 4	0,1	211,1	<0,2	62	3,6	767	6,8	15,6	85	48	29,7	44
Sitio 4	<0,1	186,1	1,6096	55,1	1,86	795	6,63	14,8	68	44	25,9	12
Sitio 4	0,1	75,7	1,0044	57,9	1,84	586	6,99	16,3	95	61	30,4	19
Sitio 4	<0,1	16,1	<0,2	43,7	0,8	855	6,94	14,2	368	314	182,6	5
Sitio 4	<0,1	114,2	1,7226	52,6	0,92	802	6,71	14,2	279	178	26,6	78
Sitio 4	<0,1	95,2	1,7752	64	1,46	674	7,5	13,8	28	22	9	12
Sitio 4	<0,1	58,6	12,8508	391,7	0,32	2620**	6,49	18,6	399	157	140,4	35
Sitio 5	<0,1	178,8	0,58	42,6	5,99	853	6,73	16,9	82	56	26,6	18
Sitio 5	0,3836	187,51	0,9006	49,9732	9,24	827	6,95	13,2	100	64	28,2	93
Sitio 5	<0,1	<0,1	<0,2	<0,1	11,53	804	7,07	15,6	87	51	23,3	59
Sitio 5	0,2	40,4	<0,2	105,8	12,88	760	7,15	16,5	112	61	38,7	136
Sitio 5	0,1	63,1	<0,2	51,4	5,6	687	7	16,5	91	53	33,4	18
Sitio 5	0,2	18,3	<0,2	45,1	0,29	573	6,96	16,3	117	73	43,9	100
Sitio 5	<0,1	26,1	<0,2	41,8	1,17	668	6,94	14,1	429	285	160,6	566
Sitio 5	<0,1	41,6	9,3908	33	0,19	829	6,75	18,2	503	327	37,2	33560
Sitio 5	<0,1	26,7	<0,2	36,3	15,85	672	7,66	15	167	104	57,4	338

Sitio 5	0,1	30,4	4,3182	52,7	3,02	794	6,55	14,8	453	295	170,4	420
Sitio 6	4,2	143,92	2,68	53,6	1,55	864	6,86	17	1170	741	43,5	86
Sitio 6	0,3418	173,818	0,47	46,9364	2,24	1783	8,8	18,1	3150	2250	56,3	1880
Sitio 6	<0,1	308,76	3,4894	97,2778	1,62	887	7,1	15,9	1940	1179	32,3	81
Sitio 6	<0,1	209,1	3,3644	74,2	1,91	1092	7,15	16,2	1870	1179	26,3	240
Sitio 6	0,2	101,5	11,8498	80,2	0,48	1040	6,84	17,3	2220	1202	45,4	118
Sitio 6	0,4	47,6	<0,2	70,5	1,18	785	7,66	15,9	1370	890	65,7	57
Sitio 6	<0,1	247,4	0,8536	80,8	0,38	1032	7,17	18,2	95	57	24,8	160
Sitio 6	0,3	123,8	8,0606	83,4	1,72	1066	6,87	18,1	460	283	164,4	187
Sitio 6	<0,1	74,2	12,2466	77,2	0,36	1000	7,73	17,2	384	262	135,1	153
Sitio 6	6,1	50,8	9,5738	75,4	1,15	858	6,77	17,3	386	248	132,1	150

Anexo 8.
Consolidación de todos los datos microbiológicos en temporada lluvia

Sitios	C. Totales (Log UFC/100mL)	<i>E. coli</i> (Log UFC/100mL)	C. Totales (Log NMP/100mL)	<i>E. coli</i> (Log NMP/100mL)
Sitio 1	6,7	5,6	5,6	5,5
Sitio 1	5,7	4,6	4,6	4,5
Sitio 1	6,1	5,4	5,4	4,7
Sitio 1	3,9	2,4	2,4	2,2
Sitio 1	4,1	3,8	3,8	2,5
Sitio 1	5,5	4,5	4,5	3,1
Sitio 2	5,5	4,0	4,0	0,7
Sitio 2	5,8	4,8	4,8	4,5
Sitio 2	5,4	4,5	4,5	3,2
Sitio 2	5,4	4,5	4,5	4,5
Sitio 2	5,7	4,5	4,5	4,1
Sitio 2	5,6	4,5	4,5	4,7
Sitio 3	3,6	2,6	2,6	0,7
Sitio 3	4,1	2,3	2,3	2,5
Sitio 3	4,9	3,7	3,7	3,5
Sitio 3	4,4	3,3	3,3	3,4
Sitio 3	4,7	3,0	3,0	3,8
Sitio 3	5,7	4,0	4,0	2,3
Sitio 4	7,9	6,7	6,7	6,0
Sitio 4	6,5	5,6	5,6	5,0
Sitio 4	7,1	6,1	6,1	5,7
Sitio 4	7,8	6,9	6,9	6,4

Sitio 4	6,9	5,9	5,9	6,0
Sitio 4	6,6	5,5	5,5	5,4
Sitio 5	4,7	3,5	3,5	2,5
Sitio 5	3,3	2,4	2,4	2,5
Sitio 5	6,8	6,4	6,4	5,7
Sitio 5	5,9	5,5	5,5	6,9
Sitio 5	7,0	6,6	6,6	3,0
Sitio 5	5,2	4,0	4,0	3,0
Sitio 6	7,5	6,8	6,8	6,5
Sitio 6	7,3	6,7	6,7	7,2
Sitio 6	7,8	7,5	7,5	8,3
Sitio 6	7,2	6,7	6,7	7,1
Sitio 6	7,9	7,0	7,0	7,1
Sitio 6	7,0	6,4	6,4	7,0

Anexo 9.
Consolidación de todos los datos microbiológicos en temporada lluvia y seca

Sitios	C. Totales (Log UFC/100mL)	<i>E. coli</i> (Log UFC/100mL)	C. Totales (Log NMP/100mL)	<i>E. coli</i> (Log NMP/100mL)
Sitio 1	6,7	5,6	5,6	5,5
Sitio 1	5,7	4,6	4,6	4,5
Sitio 1	6,1	5,4	5,4	4,7
Sitio 1	3,9	2,4	2,4	2,2
Sitio 1	4,1	3,8	3,8	2,5
Sitio 1	5,5	4,5	4,5	3,1
Sitio 2	5,5	4,0	4,0	0,7
Sitio 2	5,8	4,8	4,8	4,5
Sitio 2	5,4	4,5	4,5	3,2
Sitio 2	5,4	4,5	4,5	4,5
Sitio 2	5,7	4,5	4,5	4,1
Sitio 2	5,6	4,5	4,5	4,7
Sitio 3	3,6	2,6	2,6	0,7
Sitio 3	4,1	2,3	2,3	2,5
Sitio 3	4,9	3,7	3,7	3,5
Sitio 3	4,4	3,3	3,3	3,4
Sitio 3	4,7	3,0	3,0	3,8
Sitio 3	5,7	4,0	4,0	2,3
Sitio 4	7,9	6,7	6,7	6,0
Sitio 4	6,5	5,6	5,6	5,0
Sitio 4	7,1	6,1	6,1	5,7
Sitio 4	7,8	6,9	6,9	6,4

Sitio 4	6,9	5,9	5,9	6,0
Sitio 4	6,6	5,5	5,5	5,4
Sitio 5	4,7	3,5	3,5	2,5
Sitio 5	3,3	2,4	2,4	2,5
Sitio 5	6,8	6,4	6,4	5,7
Sitio 5	5,9	5,5	5,5	6,9
Sitio 5	7,0	6,6	6,6	3,0
Sitio 5	5,2	4,0	4,0	3,0
Sitio 6	7,5	6,8	6,8	6,5
Sitio 6	7,3	6,7	6,7	7,2
Sitio 6	7,8	7,5	7,5	8,3
Sitio 6	7,2	6,7	6,7	7,1
Sitio 6	7,9	7,0	7,0	7,1
Sitio 6	7,0	6,4	6,4	7,0
Sitio 1	5,7	4,8	4,0	3,9
Sitio 1	5,4	3,5	3,5	3,1
Sitio 1	3,5	2,5	3,9	3,4
Sitio 1	3,5	2,5	3,9	3,7
Sitio 1	3,6	2,9	3,8	3,6
Sitio 1	2,8	1,3	3,7	0,3
Sitio 1	3,0	2,3	0,9	0,3
Sitio 1	4,5	4,1	4,2	2,7
Sitio 1	4,5	4,3	5,2	4,2
Sitio 1	4,4	4,1	4,3	4,1
Sitio 2	6,7	5,5	3,5	2,3
Sitio 2	5,8	4,3	3,7	3,3
Sitio 2	4,9	3,4	4,3	4,3
Sitio 2	5,3	4,6	3,4	3,3

Sitio 2	4,9	3,3	3,7	3,4
Sitio 2	5,4	4,4	3,0	3,0
Sitio 2	6,1	5,2	3,5	3,1
Sitio 2	6,0	5,3	3,2	3,0
Sitio 2	4,7	3,8	3,1	0,9
Sitio 2	4,3	3,0	3,4	3,2
Sitio 3	3,6	3,1	3,9	3,7
Sitio 3	4,1	3,5	3,3	1,3
Sitio 3	4,1	3,8	4,2	4,0
Sitio 3	3,5	2,6	3,1	2,9
Sitio 3	3,5	3,3	3,2	0,8
Sitio 3	4,9	3,5	3,1	2,9
Sitio 3	4,4	3,9	2,9	0,7
Sitio 3	4,7	3,6	2,4	0,7
Sitio 3	3,6	2,3	2,5	2,4
Sitio 3	4,5	3,6	3,0	3,0
Sitio 4	6,4	5,7	4,5	3,9
Sitio 4	5,0	4,3	3,7	3,1
Sitio 4	6,0	5,4	5,1	4,9
Sitio 4	5,8	4,3	5,5	5,0
Sitio 4	5,5	4,0	5,4	4,4
Sitio 4	5,8	4,5	5,4	4,3
Sitio 4	6,6	5,8	6,0	6,0
Sitio 4	5,6	5,2	5,2	3,7
Sitio 4	5,2	4,0	5,0	4,4
Sitio 4	7,3	7,0	4,5	4,5
Sitio 5	5,1	4,9	7,2	7,2
Sitio 5	4,8	3,9	4,2	4,2

Sitio 5	5,3	4,3	3,7	3,5
Sitio 5	4,8	4,5	4,2	4,2
Sitio 5	4,7	4,4	5,2	4,2
Sitio 5	5,0	4,2	4,2	3,2
Sitio 5	5,5	5,2	5,2	5,2
Sitio 5	5,7	4,6	4,7	4,5
Sitio 5	6,4	6,2	4,3	4,3
Sitio 5	6,8	6,0	4,5	4,5
Sitio 6	7,2	7,8	7,2	7,2
Sitio 6	7,0	6,8	6,0	5,7
Sitio 6	6,8	6,4	7,2	7,0
Sitio 6	6,2	5,9	7,2	6,5
Sitio 6	7,4	7,4	7,2	6,2
Sitio 6	7,2	6,8	7,2	7,2
Sitio 6	7,0	6,8	7,9	7,2
Sitio 6	6,9	6,7	7,7	7,7
Sitio 6	7,3	7,1	7,7	7,5
Sitio 6	7,1	6,8	7,7	7,5

SITIOS	Ciprofloxacina		Clindamicina		Sulfametoxazol	Trimetropim	
Sitio 1	6,679	4,576	1,289	1,302	0,070	14,839	8,839
Sitio 2	-14,287	7,205	NF	NF	0,033	16,301	11,058
Sitio 3	-11,016	9,921	0,954	0,962	0,023	17,189	12,405
Sitio 4	-7,637	12,050	4,188	4,241	0,128	10,961	2,957
Sitio 5	-4,989	5,348	NF	NF	0,043	12,588	5,425
Sitio 6	-13,326	3,058	0,901	0,908	0,634	16,818	11,842
Sitio 1	-16,174	3,889	0,885	0,892	0,110	11,476	3,738
Sitio 2	-15,141	5,987	NF	NF	0,351	14,825	8,818
Sitio 3	-12,531	27,362	1,968	1,990	-0,034	18,971	15,107
Sitio 4	14,060	14,583	NF	NF	0,123	17,437	12,780
Sitio 5	-1,837	3,759	NF	NF	-0,014	9,570	0,846
Sitio 6	-15,303	9,815	NF	NF	0,929	8,199	-1,234
Sitio 1	-7,769	14,680	2,751	2,784	0,099	13,837	7,319
Sitio 2	-1,717	11,498	NF	NF	-0,003	10,455	2,189
Sitio 3	-5,676	8,655	3,361	3,402	-0,006	10,881	2,836
Sitio 4	-9,212	7,230	NF	NF	0,033	10,130	1,695
Sitio 5	-10,984	6,392	NF	NF	0,737	8,792	-0,334
Sitio 6	-12,028	8,943	NF	NF	3,231	11,306	3,479
Sitio 1	-8,853	11,883	NF	NF	0,112	15,365	9,638
Sitio 2	-5,196	7,010	2,115	2,139	0,096	12,951	5,975
Sitio 3-1	-11,258	11,218	2,420	2,448	0,039	13,649	7,034
Sitio 3	-6,024	8,667	3,408	3,450	0,443	10,615	2,432
Sitio 4	-9,197	8,856	2,613	2,644	0,260	9,243	0,350
Sitio 5	-8,962	4,370	2,682	2,714	0,217	13,362	6,599
Sitio 6	-14,543	11,601	NF	NF	14,295	17,552	12,956
Sitio 1	-5,547	7,400	NF	NF	0,087	11,202	3,322
Sitio 2	-10,774	8,845	NF	NF	0,016	10,715	2,583
Sitio 3	-8,976	11,143	1,329	1,342	0,030	9,957	1,433
Sitio 4	-6,118	7,485	2,363	2,390	0,148	10,578	2,375
Sitio 5	-10,668	1,345	NF	NF	0,228	10,180	1,772
Sitio 6	-18,306	19,138	NF	NF	0,468	8,418	-0,901
Sitio 1	3,829	16,783	3,293	3,334	-0,013	12,097	4,679
Sitio 2	0,899	16,237	1,517	1,533	-0,001	13,833	7,313
Sitio 3	0,220	5,644	NF	NF	0,018	12,698	5,592
Sitio 4	-12,959	2,998	1,285	1,298	0,028	16,527	11,401
Sitio 5	-16,250	6,724	NF	NF	0,238	4,611	-6,677
Sitio 6	-11,614	17,782	NF	NF	48,241	102,458	141,761
Sitio 1	2,143	19,175	NF	NF	0,138	18,136	13,841
Sitio 2	3,875	13,083	1,302	1,315	-0,026	21,117	18,363
Sitio 3	-3,704	9,603	NF	NF	0,024	25,241	24,620
Sitio 4	-8,033	14,159	1,378	1,392	0,019	29,299	30,775
Sitio 5 -1	-2,365	15,576	0,800	0,806	0,017	38,205	44,286
Sitio 5	-0,603	15,168	NF	NF	-0,011	36,741	42,066
Sitio 6	-1,110	6,298	0,030	0,025	0,118	117,281	164,247
Sitio 1	-12,144	8,625	1,409	1,424	0,025	10,132	1,699
Sitio 2	-9,249	11,710	1,218	1,230	-0,031	15,377	9,656
Sitio 3	-5,411	4,965	2,384	2,412	0,016	14,611	8,493
Sitio 4	-13,803	11,501	1,537	1,553	0,237	21,231	18,536
Sitio 5	-5,672	32,117	NF	NF	0,315	10,844	2,779
Sitio 6	19,976	21,902	NF	NF	3,558	26,251	26,152
Sitio 1	7,268	22,884	NF	NF	0,070	36,615	41,875
Sitio 2	8,490	22,260	2,609	2,640	-0,009	20,509	17,441
Sitio 3	7,712	16,804	0,221	0,219	0,134	29,760	31,475
Sitio 4	0,925	NF	0,639	0,643	0,324	27,304	27,750

Sitio 5	NF	17,047	NF	NF	0,168	NF	NF
Sitio 6	1,227	22,001	1,574	1,591	-0,015	40,518	47,795
Sitio 1	7,390	13,148	1,208	1,219	0,024	26,075	25,885
Sitio 2	-3,622	25,037	0,518	0,520	0,110	35,172	39,685
Sitio 3	11,168	10,653	1,885	1,906	-0,023	26,524	26,566
Sitio 4	-6,727	8,392	6,205	6,287	0,082	19,038	15,209
Sitio 5	-9,540	2,109	0,156	0,152	0,054	25,923	25,654
Sitio 6	-17,356	19,269	NF	NF	0,196	15,557	9,929
Sitio 1-1	3,992	67,362	2,511	2,541	0,003	21,022	18,220
Sitio 1	63,821	34,164	NF	NF	-0,024	35,108	39,588
Sitio 2	22,522	25,039	1,397	1,411	0,346	60,648	78,333
Sitio 3	11,170	17,445	NF	NF	0,002	31,447	34,035
Sitio 4	1,722	23,504	6,893	6,984	0,031	17,748	13,253
Sitio 5	9,261	6,135	NF	NF	4,008	18,828	14,891
Sitio 6	-12,347	16,280	NF	NF	10,528	34,185	38,188
Sitio 1	0,274	32,336	2,448	2,476	0,008	26,976	27,251
Sitio 2	20,248	23,616	2,560	2,590	0,098	22,360	20,250
Sitio 3	9,400	2,901	3,566	3,610	0,032	19,994	16,660
Sitio 4-1	-16,371	3,295	NF	NF	0,694	9,521	0,772
Sitio 4	-15,880	13,217	NF	NF	0,031	10,547	2,328
Sitio 5	-3,537	5,088	0,133	0,129	0,382	38,381	44,553
Sitio 6	-13,649	21,319	NF	NF	3,085	21,911	19,568
Sitio 1	6,542	9,235	2,545	2,575	0,021	27,482	28,020
Sitio 2	-8,491	7,743	NF	NF	-0,036	16,920	11,996
Sitio 3	-10,347	10,190	1,573	1,590	0,104	31,936	34,776
Sitio 4	-7,302	9,058	1,415	1,429	0,256	29,096	30,467
Sitio 5	-8,711	0,903	NF	NF	0,015	31,575	34,228
Sitio 6	-18,856	13,326	NF	NF	2,569	33,923	37,791
Sitio 1	-3,402	14,493	2,961	2,997	0,003	22,843	20,982
Sitio 2	-1,950	26,160	NF	NF	-0,053	19,151	15,381
Sitio 4	12,564	19,618	3,880	3,929	0,048	20,930	18,080
Sitio 5	4,425	16,531	0,239	0,237	-0,039	20,603	17,584
Sitio 6	0,585	9,768	0,625	0,629	0,291	22,462	20,403
Sitio 1	-7,828	15,012	1,332	1,345	0,093	22,547	20,533
Sitio 2	-1,304	6,284	0,302	0,301	0,006	22,378	20,276
Sitio 3	-12,162	16,728	1,036	1,046	0,129	23,546	22,048
Sitio 4	0,830	63,503	NF	NF	0,399	25,793	25,457
Sitio 5	59,020	13,865	0,172	0,169	0,444	47,461	58,328
Sitio 6	-2,731	25,091	NF	NF	51,895	134,631	190,567
Sitio 1	11,234	14,182	2,337	2,364	0,056	26,252	26,153
Sitio 2	-2,337	10,433	NF	NF	0,167	24,723	23,833
Sitio 3	-7,000	22,277	2,549	2,579	-0,016	29,012	30,341
Sitio 4	7,734	0,297	NF	NF	0,685	28,026	28,844
Sitio 5	-19,610	3,532	NF	NF	-0,024	NF	NF
Sitio 6	-15,585		NF	NF	0,372	8,621	-0,594